

IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN
ZUR ABWEHRSITUATION BEI DER
POSTOPERATIVEN NEUGEBORENEN-SEPSIS
VOR UND NACH AUSTAUSCHTRANSFUSION

Aloisia Prinz - Hülsmann

1980
—

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

In-vitro-Untersuchungen zur Abwehrsituation bei
der postoperativen Neugeborenen-Sepsis
vor und nach Austauschtransfusion

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Aloisia Prinz-Hülsmann

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität

Berichterstatter: Prof. Dr. Marget

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hecker

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1980



Ich danke Herrn Prof. Marget für die Überlassung
des Themas und die freundliche Unterstützung im
Laufe dieser Arbeit.

Besonders danke ich Herrn Dr. Belohradsky für die
unermüdliche Bereitwilligkeit zu Diskussionen und
Anregungen, sowie den Assistentinnen Lotte Ottosson
und Inge Voigt für die gute Zusammenarbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548305_0052

1	ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN	
1.1	<u>Abkürzungen</u>	1
1.2	<u>Definitionen</u>	2
2	EINLEITUNG	
2.1	<u>Problematik</u>	4
2.1.1	Infektionsanfälligkeit von NG und FG aufgrund des physiologischen Immundefekts	4
2.1.1.1	Spezifische Abwehrmechanismen	6
2.1.1.2	Unspezifische Abwehrmechanismen	10
2.1.1.2.1	Humorales B-Zell-System	10
2.1.1.2.2	Zelluläres T-Zell-System	13
2.1.2	Operation und iatrogene Infektion	17
2.1.2.1	Operation und immunsuppressiver Effekt	17
2.1.2.2	Postoperative Infektionsexposition	19
2.1.2.3	Das Problem der NG-Sepsis	19
2.2	<u>Versuch der Immuntherapie bei der NG-Sepsis</u>	20
2.2.1	Ziel der Austauschtransfusion bei der NG-Sepsis	21
2.2.2	Technik der Austauschtransfusion	22
2.2.3	Indikationen zur Austauschtransfusion	23
2.2.4	Risiken der Austauschtransfusion	24
2.2.5	Mortalitätsrate bei Austauschtransfusion	25
2.3	<u>Fragestellung</u>	26

3	TESTMATERIAL, PATIENTENGUT und METHODEN	
3.1	<u>Testmaterial</u>	27
3.2	<u>Patientengut</u>	29
3.2.1	Patienten mit ATT nach postoperativer Sepsis	29
3.2.2	Chirurgische Kontrollpatienten ohne Sepsis und ohne ATT	31
3.2.3	Erwachsene Kontrollpersonen	31
3.2.4	Postoperative Sepsisfälle ohne ATT	31
3.2.5	Spenderblut	
3.2.6	Postoperative Sepsisfälle mit ATT aus den Jahren 1974 - 77.	36
3.3	<u>Methoden</u>	37
3.3.1	Bakterizidie-Test	37
3.3.1.1	Schema des Versuchsablaufs	37
3.3.1.1.1	Herstellung einer Granulozytensuspension	39
3.3.1.1.2	Herstellung einer Bakteriensuspension	40
3.3.1.1.3	Herstellung des Serum-Ansatzes	41
3.3.1.1.4	Verdünnung der verschiedenen Testzusätze	41
3.3.1.2	Versuchsansatz	42
3.3.1.3	Anwendung des Bakterizidie-Tests für unterschiedliche Fragestellungen	44
3.3.2	Die Eliminierung von Antibiotika aus dem Serum	45
3.3.2.1	Ultrafiltration	45
3.3.2.2	Globulinfällung mit Ammoniumsulfat	46
3.3.2.3	Dialyse	47
3.3.3	Hemmhoftest	47
3.3.4	Quantitative Bestimmung von Serumproteinen	47
3.3.4.1	Durchführung	47
3.3.4.2	Anwendung der quantitativen Serumproteinbestimmung	48
3.3.5	Elektrophoretische Bestimmung von Serumproteinen	48
3.3.6	Trypanblau-Färbung	48
3.3.7	Statistische Auswertung	48

	Seite
4	ERGEBNISSE
4.1	<u>Antibiotika-Eliminierung</u> 50
4.1.1	Ultrafiltration 50
4.1.2	Globulinfällung 52
4.1.3	Dialyse 54
4.1.4	Anwendung der Antibiotika-Eliminierung auf den Bakterizidie-Test 58
4.2	<u>Die Abwehrsituation der verschiedenen Testper- sonengruppen in Abhängigkeit von Alter, Sepsis und ATT</u>
4.2.1	Die Abhängigkeit des Bakterienwachstums und der Bakterienabtötung von der Zeit 60
4.2.1.1	Bakterienwachstum in Abwesenheit von bakteri- ziden Zusätzen (Granulozyten, Serum) 60
4.2.1.2	Abtötungsquotienten von <i>Serratia marcescens</i> bzw. <i>Staphylococcus aureus</i> im Ansatz mit zel- lulären und humoralen Immunfaktoren 60
4.2.1.3	Abtötungsrate im Ansatz mit Kontrollgranulo- zyten ohne Zusatz von Serum 66
4.2.2	Die immunologische Situation bei postoperati- ven Sepsisfällen vor und nach ATT 67
4.2.2.1	Immunglobulin- und C3c-Konzentration 67
4.2.2.2	Serumbakterizidie 70
4.2.2.2.1	Vergleich der Abtötungsquotienten vor und nach der 1. ATT 72
4.2.2.2.2	Vergleich der Abtötungsquotienten vor und nach der 2. ATT 77
4.2.2.2.3	Verlaufskontrollen bei überlebenden Patien- ten nach ATT 82
4.2.2.3	Die Granulozytenfunktion ausgedrückt durch den Abtötungsquotienten im <u>direkten</u> Test. 84
4.2.3	Vergleich der immunologischen Situation bei chirurgischen Kontrollen vor und nach Opera- tion 85
4.2.3.1	Immunglobulinkonzentration 85
4.2.3.2	Abtötungsquotienten 85

4.3	<u>Abnahme der Bakterizidie von Granulozyten und Serum in Abhängigkeit von der Lagerdauer</u>	
4.3.1	Immunglobulin- und C3c-Konzentration	89
4.3.2	Bakterienabtötungsquotient	89
4.3.2.1	Abnahme der bakteriziden Aktivität von Granulozyten bei Lagerung von Vollblut	89
4.3.2.2	Aktivitätseinbuße der humoralen Faktoren durch Lagerung	91
5	ZUSAMMENFASSUNG der ERGEBNISSE	
5.1	<u>Antibiotika-Eliminierung</u>	93
5.2	<u>Die Abwehrsituation im Vergleich von Erwachsenen und dem Serum von Säuglingen und NG</u>	94
5.3	<u>Behandlungserfolg durch die ATT</u>	95
5.3.1	Vergleich der Abtötungsquotienten	95
5.3.2	Vergleich der Serumproteinkonzentrationen	96
5.3.3	Vergleich der Letalität	96
5.4	<u>Vergleich der Immunantwort von Säuglingen vor und nach Operation</u>	98
5.5	<u>Abnahme der Abwehrfunktion des ATT-Blutes durch die Lagerdauer</u>	98

6	DISKUSSION	
6.1	<u>Beurteilung der Methoden</u>	100
6.1.1	Reproduzierbarkeit des Bakterizidietests	100
6.1.2	Auswirkungen des Dialyseverfahrens auf die Testergebnisse	104
6.1.3	Relevanz der in-vitro-Bakterizidie im Ver- hältnis zum in-vivo-Geschehen	106
6.2	<u>Beurteilung der Ergebnisse</u>	107
6.2.1	Bakterizidie und Immunglobulinkonzentration im Hinblick auf die AT _T und die Operation	107
6.2.2	Veränderung der humoralen und zellulären Immun- faktoren während der Lagerung von AT _T -Blut	108
7	ZUSAMMENFASSUNG	110
8	LITERATURVERZEICHNIS	113
9	LEBENS LAUF	121

1 ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

1.1 Abkürzungen

ACD-Blut	"acid-citrate-dextrose"-Blut
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATT	Austauschtransfusion
B	Bakterium
C1, C2, C3	Komplementfaktoren
<u>C1</u> usw.	aktivierte Komplementfaktoren
Cla usw.	Spaltprodukte von Komplementfaktoren
2.3 DPG	2.3-Diphosphoglycerat
FG	Frühgeborenes
G	Geschlecht
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin A, G, M
K I, II	Kontrollgranulozyten I, II
k ₀	Konzentration zur Stunde 0
k ₁	Konzentration nach 60 min.
k ₂	Konzentration nach 120 min.
NBT-Test	Nitroblau-Tetrazolium-Test
NG	Neugeborenes
Se	Serratia marcescens
Sg	Säugling
SSW	Schwangerschaftswoche
Sta	Staphylococcus aureus
t ₀	Zeitpunkt 0
t ₁	Zeitpunkt der Messung nach 60 min.
t ₂	Zeitpunkt der Messung nach 120 min.

1.2

Definitionen

Spenderblutarten:

Frischblut: 12 - 72 Std. nach Blutentnahme
Warmblut: weniger als 12 Std. nach Blutentnahme
Konservenblut: mehr als 72 Std. nach Blutentnahme

Bakterizidie-Test: Test zur Bestimmung der Bakterien-
abtötungsrate (siehe Methoden 3.3.1)

Bakterienabtötungsquotient: Differenz der Anfangs- und
Endkonzentration der gezählten Bak-
terienkolonien in Prozent vom Aus-
gangswert.

$$Q = \frac{k_0 - k_2}{k_0} \cdot 100$$

Bakterienabtötungsrate: Abhängigkeit der Zahl der Bak-
terienkolonien von der Inkubations-
zeit

$$R = k f(t)$$

Patienten:

Kontrollen: erwachsene Kontrollpersonen (I,II)
chirurgische Kontrollen: Neugeborene und Säuglinge vor und
nach Operation
ATT-Patienten: postoperative Sepsisfälle vor und
nach Austauschtransfusion
Neugeborene: Säuglinge bis zum 28. Tag post
partum
Säuglinge: Kinder bis zur Vollendung des
1. Lebensjahres
Frühgeborene: Neugeborene mit weniger als
37 Schwangerschaftswochen bei der
Geburt

2 EINLEITUNG

2.1 Problematik

Noch 1966 betrug der Anteil der NG-Sterblichkeit (definiert als die Häufigkeit der Sterbefälle in einer Population von NG bis zum 28. Lebenstag) 74% der Säuglingssterblichkeit (Anteil der innerhalb des ersten Lebensjahres verstorbenen Säuglinge bezogen auf die Zahl der Lebendgeborenen). Die Säuglingssterblichkeit wurde 1968 für Deutschland noch mit 2.3% angegeben (14). Sie ist in den zivilisierten Ländern im Laufe dieses Jahrhunderts deutlich zurückgegangen und wird im internationalen Vergleich als Ausdruck des medizinisch-hygienischen Niveaus eines Landes angesehen.

2.1.1 Infektionsanfälligkeit von NG und FG aufgrund des physiologischen Immundefekts.

In Deutschland wird die Infektionsrate bei allen lebendgeborenen NG mit 5 - 15% (14), bzw. mit 7 - 30% (3) beziffert. Beim FG ist sie u.a. aufgrund der immunologischen Unreife bis zu sechs Mal so hoch (53). Die Letalität infolge einer Sepsis unter Antibiotikabehandlung liegt selbst bei antibiotika-empfindlichen Keimen zwischen 25 - 80% (33, 35, 37). An der NG-Sterblichkeit ist die Sepsis mit etwa 2 - 20% beteiligt (30).

Die erhöhte Infektionsanfälligkeit der männlichen gegenüber den weiblichen NG ist signifikant (37, 58). Diese Beobachtung wird auf die Annahme zurückgeführt, daß auf dem X-Chromosom liegende Gene eine Rolle bei der Immunglobulin-Synthese spielen und somit weibliche NG eine größere Immunkapazität durch die beiden X-Chromosomen besitzen. Eine erhöhte Infektionsrate wird bei

männlichen Kindern für fast alle Mikroorganismen, bei NG hauptsächlich für gram-negative Bakterien beschrieben (58).

Die infektions-immunologische Reaktion von NG und FG auf eingedrungene Mikroorganismen scheint also im Vergleich zu Erwachsenen noch unausgereift zu sein bzw. verlangsamt abzulaufen. Es erhebt sich deshalb vor allem aus therapeutischer Sicht die Frage, welcher Schritt im Prozess der Erkennung und Elimination von Antigenen diese Abwehrschwäche bedingt und ob es sich um einen quantitativen oder qualitativen Defekt handelt.

Zu dieser Fragestellung existiert eine Reihe von Untersuchungen, in welchen die verschiedenen Kompartments des spezifischen und unspezifischen Immunsystems beim NG der Abwehrleistung von Erwachsenen gegenübergestellt werden.

2.1.1.1 Spezifische immunologische Abwehrmechanismen

Die spezifische Abwehr besteht in der Erkennung von körperfremden Substanzen mit anschließender Ag/Ak-Reaktion, der die Neutralisation (z.B. Abtötung) und Elimination aus dem Organismus durch unspezifische Mechanismen folgt.

Bei der Erkennung des Ag können humorale und zelluläre Faktoren zum Einsatz kommen. Hierbei sind die immunoglobulin-synthetisierenden B-Lymphozyten (humorale Abwehr) in erster Linie auf Bakterien ausgerichtet. Die T-Lymphozyten (zelluläre Abwehr) sind hauptsächlich an der Abwehr von Transplantaten beteiligt, aber auch an der Abwehr von Tumorzellen, Viren und Pilzen. In der Regel bedarf es jedoch der Kooperation zwischen B- und T-Lymphozyten (Ak-abhängige Zytotoxizität) um eine Ak-Produktion in Gang zu setzen, da zur Erkennung von Träger und Hapten beide Zellsysteme notwendig sind (24).

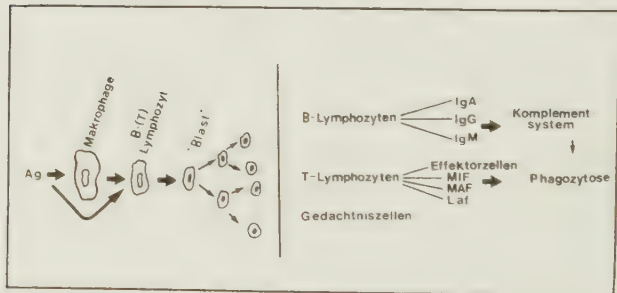


Abb. 1: Ag- Wirkung auf die immunkompetente Zelle mit Entstehung Ag-spezifischer Lymphozytenpopulationen (57).

Das Ag trifft bei einer primären Immunantwort auf eine virginelle Zelle oder Prekursorzellen, die hierdurch aktiviert wird und sich zu teilen beginnt (Abb 1). Bei starker Antigenität des eindringenden Agens scheint die Erkennung durch Lymphozyten selbst zu erfolgen, bei einem schwachen Ag wird sie durch Monozyten vermittelt. Als Folge der Ag/Ak-Reaktion wird der Lymphozyt zum Lymphoblasten, aus dem sich durch Zellteilung Plasmazellen bzw. Effektorzellen und Gedächtniszellen entwickeln (Zellproliferation).

Lange Zeit wurde das NG für immunologisch inkompetent gehalten. Die Anzahl der B- und T-Lymphozyten beträgt jedoch beim NG schon 100% der Erwachsenen-Norm, wobei diese Zellen schon zu etwa 70 - 80% funktionsfähig sind (Abb. 4). Inzwischen konnte auch eine spezifische Immunreaktion in Form einer IgM-Synthese nach Ag-Kontakt nachgewiesen werden, die 20 - 30 Tage anhält und anschließend durch einen Anstieg von IgG abgelöst wird. Tatsächlich ist die Immunglobulinsynthese schon ab der 24. Gestationswoche möglich (59).

Aufgrund dieser Erkenntnisse muß die Ursache der verlangsamen bzw. verspätet einsetzenden Erkennungsreaktion weniger als Folge eines quantitativen Defekts als vielmehr im Rahmen der fehlenden Sensibilisierung betrachtet werden. Auch in einem späteren Lebensalter ist jede Sekundärreaktion gegenüber der Primärreaktion auf das gleiche Ag durch eine wesentlich geringere Latenzzeit, durch niedrigeren Immunogenbedarf, durch längere und intensivere Immunantwort und schließlich durch eine höhere Affinität zum entsprechenden Ag ausgezeichnet (59), (Abb. 2). Die beschleunigte Sekundärreaktion ist auf die erhöhte IgG-Konzentration im Serum und auf die spezifischen Gedächtniszellen (Abb. 1) zurückzuführen.

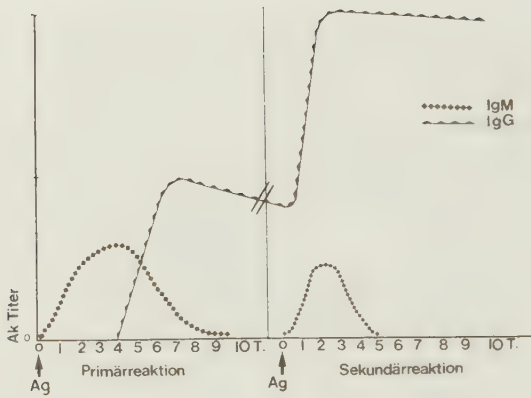


Abb. 2: Verlauf des Ak-Spiegels im Serum nach Primär- und Sekundärkontakt mit dem gleichen Ag (24).

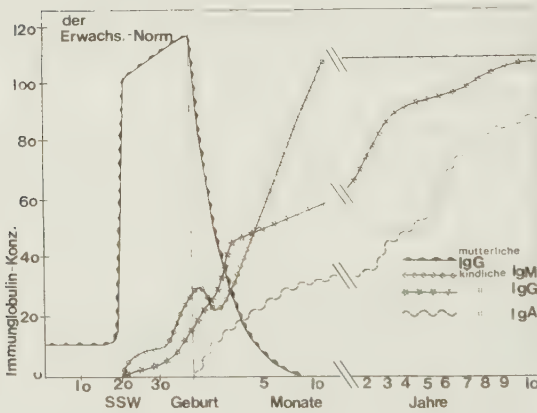


Abb. 3: Immunglobulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Lebensalter (10).

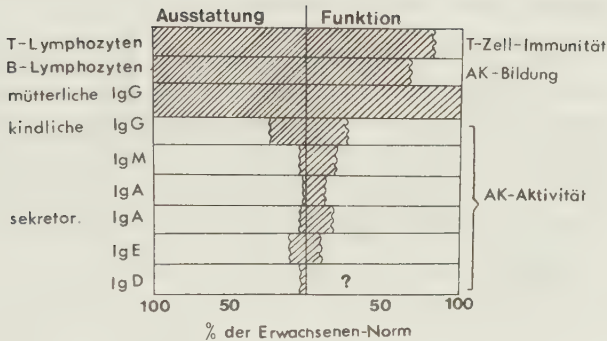


Abb. 4: Ausstattung und Funktion der spezifischen Immunsysteme des NG im annähernden, prozentualen Vergleich zur Erwachsenen-Norm. (4)

Funktion der Immuglobuline

IgA-Antikörper üben eine Schutzfunktion gegenüber Viren und Bakterien auf der Schleimhautoberfläche aus, IgM-Antikörper weisen eine besondere Affinität gegenüber Endotoxinen von gram-negativen Bakterien auf (30), und IgG-Antikörper richten sich vor allem gegen gram-positive Bakterien (59, 54)

Aus der Serumkonzentration der Immuglobuline (vor allem aus dem niedrigen IgM- und dem hohen IgG-Spiegel) und ihrer Funktion kann geschlossen werden, daß NG in erster Linie durch gram-negative Keime gefährdet sind, während Säuglinge etwa ab der 10. Lebenswoche nach Abbau der passiv übertragenen IgG und vor Einsetzen der Eigenproduktion zusätzlich noch anfällig werden für pyogene gram-positive Bakterien (59, 30, 53). Zu dem für die NG-Sepsis charakteristischen bakteriellen Erregerspektrum zählen demnach in erster Linie E. coli, Pseudomonas, Proteus-Spezies, Klebsiellen, nicht zuletzt aber auch Streptokokken der Gruppe B und Staphylokokkus aureus.

Die biologischen Folgereaktionen sind z.B. die Virus-neutralisation, die Opsonisierung von Bakterien, Chemotaxis und Zytolyse.

Opsonisierung und Immunadhärenz

Die Opsonisierung ist eine durch den aktivierten Komplementfaktor EAC ~~1423~~¹⁴²b ausgelöste Reaktion. Sie dient der erleichterten Phagozytose durch Veränderung der Oberfläche des Ag/Ak-Komplexes. Zu den Opsoninen zählen die Serumkomponenten IgG1 und IgG3, C3b (Hauptopsonin), C4b und IgM.

Durch die Immunadhärenz wird der Immunkomplex an die Phagozytenmembran gebunden.

Die Aussagen aus Untersuchungen von NG-Opsoninkonzentrationen sind sehr uneinheitlich. Es wird über eine Störung der Opsonisierung von *E. coli* und *Serratia marcescens* berichtet, wobei jedoch bei *Staphylokokkus aureus* keine verminderte Opsonisierung gefunden wurde (60). Andere Autoren konnten auch gegen *Serratia marcescens* keinen Opsonisierungseffekt feststellen und in weiteren Arbeiten wurde wiederum ein unterschiedliches Opsonierungsverhalten in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht beschrieben (38).

Chemotaxis-Faktor

Die Chemotaxis ist die gerichtete Migration des polymorphkernigen Granulozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens. Dieser Vorgang wird ausgelöst durch die Faktoren C5a und C3a und den C567-Komplex (39) und zwar durch Spaltung von C3a und C5a und durch Fusion von C5b, C6 und C7. Auch für die Chemotaxis wurde beim NG ein signifikant niedrigerer Wert als für Erwachsene gemessen (38). Die ungerichtete Bewegungsfähigkeit des polymorphkernigen Granulozyten ist zwar normal, die gerichtete Migration und die Deformierbarkeit sind je-

doch stark beeinträchtigt; beide Faktoren weisen eine enge Beziehung zur Chemotaxis auf. Dieser Defekt ist wahrscheinlich auf eine verminderte C3- und C5-Konzentration zurückzuführen und kann durch die alleinige Zufuhr von IgM nicht behoben werden (38).

Für die folgenden Komplementfaktoren sind beim NG verminderte Konzentrationen nachgewiesen worden (59):

Cla = 75 % der Erwachsenenkonzentration

C3 = 56 % " "

C4 = 55 % " "

C5 = 60 % " "

Da für den gesamten Ablauf des Komplementsystems alle einzelnen Komponenten erforderlich sind, dürften beim NG sowohl die Adhärenz, die Opsonisierung, die Chemotaxis und die Zytolyse erheblich vermindert sein. Aufgrund eines Faktor-B-Mangels ist auch das Properdin-System gestört.

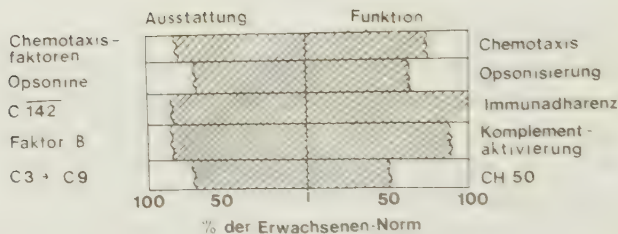


Abb. 6: Ausstattung und Funktion des unspezifischen humoralen Abwehrsystems beim NG im annähernd prozentualen Vergleich zur Erwachsenen-Norm (4).

2.1.1.2.2 Zelluläres T-Zell-System

Die durch Ag-Kontakt sensibilisierten T-Lymphozyten können in Effektorzellen übergehen oder eine Reihe von Mediatoren abgeben, welche eine Wirkung auf unspezifische Phagozyten haben (Abb. 1). Phagozyten sind vor allem Granulozyten und Monozyten. Granulozyten bilden die sogenannte erste Verteidigungslinie in der Infektionsabwehr und gehen nach Phagozytose und Abtötung von Keimen zugrunde. Monozyten (als zweite Verteidigungslinie) können sich zu gewebsgebundenen Makrophagen (RES) differenzieren; außerdem haben sie sehr wahrscheinlich auch einen stimulierenden Effekt auf die Antikörperbildung, indem sie nach Ag-Bindung Fragmente des Immunogens mit einer RNS-Hälfte zu einem Komplex verbinden ("Superantigen"), welcher die den Monozyten umgebenden "ruhenden" kleinen Lymphozyten zur Proliferation stimuliert (Abb. 1).

Phagozytose und intrazelluläre Abtötung

Die Phagozytose wird durch die erwähnten Interaktionen humoraler Faktoren des Komplement- und B-Zell-Systems eingeleitet, durch Chemotaxis, Opsonisierung und Immunadhäsion.

Außerdem können die Phagozyten durch die oben genannten Mediatoren des T-Zell-Systems am Ag-Ort festgehalten bzw. aktiviert werden (MIF, MAF).

Nach Migration der Phagozyten zum Antigen-Ort, Bindung des Antigens an die Granulozytenmembran und Phagozytosesteigerung durch Opsonisierung beginnt der Phagozytosevorgang mit der Einstülpung des Plasmalemm und Bildung einer Vakuole (Phagosom).

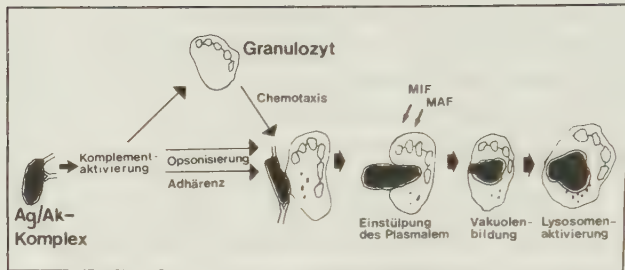


Abb. 7: Schematischer Ablauf der humoralen und zellulären Abwehrreaktionen (bei z.B. bakteriellen Infektionen)

Die für das physikalische und biochemische Geschehen sowie für die Synthese neuer Plasmamembranen notwendige Energie stammt aus der anaeroben Glykolyse.

Im nächsten Schritt entsteht durch die Fusion der Phagosomenmembran mit einem Lysosom ein Phagolysosom (Abb. 7). Der im Anschluß an die Entleerung des Granulinhalts in die Vakuole des Phagolysosoms beobachtete "respiratory burst" besteht wahrscheinlich in der Aktivierung von NADH- und NADPH-Oxidase, wobei unter Sauerstoffverbrauch Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses bringt zusammen mit dem Enzym der granulozytären Myeloperoxidase Halogenide (vor allem Jodid) in eine biologisch aktive, proteingebundene Form, in welcher sie sich an die Bakterienwand binden und zur Zerstörung der Bakterien beitragen. Gleichzeitig wird das Ag von sogenannten basischen Proteinen und Lysozymen angegriffen. Hydrolasen tragen zur endgültigen Digestion bei.

Intrazelluläre Abtötung	
sauerstoffabhängige Reaktionen	sauerstoffunabhängige Reaktionen
Myeloperoxidase-abhängige Reaktionen	Säure
Myeloperoxidase-unabhängige Reaktionen	Lysozym
- H_2O_2	Laktoferrin
- Superoxid-Anion	Basische Proteine
- Hydroxylradikal	
- Sauerstoffsinglet	

Tab. 1: Reaktionen der intrazellulären Abtötung von Bakterien im polymorphkernigen Granulozyten (21).

Die eigentliche Phagozytose, d.h. die Einstülpung der Granulozytenmembran, wird beim Neugeborenen als normal beschrieben (62,60). Anderen Autoren zufolge ist jedoch diese Funktion bei 90% aller gesunden NG erst 24 Stunden nach der Geburt nachweisbar (26).

Die NBT-Reduktion (siehe Definitionen) als Maß der intrazellulären biochemischen Vorgänge zur Abtötung von Bakterien wird von den verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben: einerseits wird bei NG innerhalb von 12 Stunden post partum eine erniedrigte NBT-Reduktion beobachtet (26,41), andererseits ermittelten Humbert et al. (18) beim gesunden NG und FG eine erhöhte NBT-Reduktion in Ruhe und während der Phagozytose, deren Ursache nicht bekannt ist und die sich 4 Wochen post partum normalisiert (41).

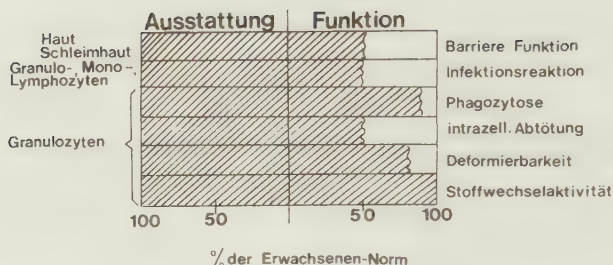


Abb. 8: Ausstattung und Funktion des unspezifischen zellulären Abwehrsystems beim NG im annähernd prozentualen Vergleich zur Erwachsenennorm.(4)

Zusammenfassend zeigt eine Gegenüberstellung der Abbildungen 3, 6 und 8, daß die spezifische und unspezifische zelluläre Abwehr (Anzahl der T-Lymphozyten, Phagozytose und intrazelluläre Abwehr) beim NG im Gegensatz zum Erwachsenen nicht erheblich beeinträchtigt ist, während die spezifische und unspezifische humorale Immunität (also Ak-Bildung und Komplementaktivierung) deutlich gestört ist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Immundefekt beim NG und FG bedingt ist durch die noch nicht erfolgte Sensibilisierung (siehe Abb. 1) des Immunsystems und durch einen quantitativen und funktionellen Defekt des Komplementsystems.

Da die Phagozytose in großem Maße beeinflusst ist durch die Ak-Konzentration und die ungestörte Komplementbindungsreaktion (Abb. 7), wird durch einen Defekt der serumabhängigen Bakterizidie indirekt auch das zelluläre System, d.h. die intragranulozytäre Abtötung, beeinträchtigt.

2.1.2 Operation und iatrogene Infektion

Das postoperative Sepsisrisiko wird beim NG mit über 50% angegeben (56). Diese Komplikation wird gerade beim NG mit schweren angeborenen Fehlbildungen (z.B. des Verdauungstraktes) oft durch den lebensnotwendigen operativen Eingriff unmittelbar nach der Geburt gezwungenermaßen herbeigeführt.

Das hohe Sepsisrisiko führt zu der Frage, ob bei der Operation im NG-Alter zusätzlich zu der induzierten Keimverschleppung (z.B. bei Eröffnung des Darmtraktes) eine Immunsuppression durch das Operationstrauma oder die Narkose stattfindet.

2.1.2.1 Operation und immunsuppressiver Effekt

Die immunsuppressiven Effekte verschiedener Narkosearten wurden in zahlreichen Studien untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen immunologischen Methoden konnten jedoch keine einheitlichen Daten ermittelt werden. Vielfach wurde versucht, den einzelnen Narkotika einen bestimmten Stellenwert als Immunsuppressive zuzuordnen. Halothan, Stickstoffoxyd und Barbiturate sollen eine Leukopenie hervorrufen (27), Äther eine Leukozytose im peripheren Blut (29), dasselbe wurde auch bei kombinierter Narkose festgestellt (7).

Außerdem scheint die Lymphozytenproliferation (Abb. 1) auf Mitogene und Antigene durch Cyclopropan und Äther stark herabgesetzt zu sein (42). Andere Autoren führen die verschlechterte Immunsituation auf das Gewebstrauma zurück (51). Es wird berichtet von einer wochenlang anhaltenden Immunschwächung (16), andererseits auch wieder von einer schnellen Regeneration.

Die Daten in Tab. 2 stammen aus einer Studie an chirurgischen Patienten, in welcher der immunsuppressive Effekt nach der Art des operativen Eingriffs ohne Beachtung der Narkoseart untersucht wurde.

Untersuchter Immunfaktor	Anstieg (+) Abnahme (-)	Statisti- sche Wertung	Zeitpunkt der Messung postoperativ (in Std.)
Leukozytenzahl (= Granulozyten + Monozyten)	+	$p \leq 0.001$	2, 18
Lymphozytenzahl	-	$p \leq 0.001$	2, 18
T-Lymphozytenzahl (absolut)	-	$p \leq 0.001$	2, 18
T-Lymphozytenzahl (anteilmäßig)	-	$p \leq 0.05$	2, 18
B-Lymphozytenzahl (absolut)	-	$p \leq 0.05$	2
	+	$p \leq 0.01$	18
B-Lymphozytenzahl (anteilmäßig)	+	$p \leq 0.01$	18
IgG im Serum	-	$p \leq 0.01$	6. Tag
IgM im Serum	+	$p \leq 0.001$	6. Tag

Tab. 2: Postoperative Veränderungen im Immunsystem (48).
 $p \leq 0.001$ = hochsignifikant
 $p \leq 0.01$ = signifikant
 $p \leq 0.05$ = statistisch auffällig

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch Narkose und/oder Operation die zelluläre Abwehr für beschränkte Zeit und in unterschiedlichem Ausmaß abnimmt, während die humorale Immunantwort nicht beeinträchtigt ist und sogar postoperativ aktiviert zu werden scheint.

2.1.2.2 Postoperative Infektionsexposition

Intensivpflegerische Maßnahmen wie z.B. Trachealtuben, Venenkatheter und Beatmungsgeräte u.a. die schützende Barriere der Körperoberfläche durchbrechende Maßnahmen können zur bakteriellen Kontamination und Invasion führen (34). Im feuchten Milieu des Ultraschallverneblers können sich potentiell pathogene Erreger, hauptsächlich gram-negative Enterobakterien, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* u.a., ansiedeln.

Ein längerer Aufenthalt auf der Intensivstation fördert vor allem Infektionen durch opportunistisch pathogene Keime, die bei gesunden Kindern kaum Infektionen bewirken. Dies ist vor allem zurückzuführen auf Erreger, die in Koexistenz mit vielen gesunden Keimträgern (z.B. dem Intensivpersonal) leben. Bei NG und FG mit der beschriebenen verminderten Abwehrlage entsteht hierdurch eine besondere Gefahr.

Ein weiterer Risikofaktor der Intensivstationen im besonderen und Krankenhäusern im allgemeinen ist die Resistenzentwicklung gegen Antibiotika durch Übertragung von R-Faktoren von Bakterienart zu Bakterienart und sogar auf die normale Darmflora (32). Dieses Phänomen wird hervorgerufen durch eine einseitige, prophylaktische, oft nicht ausreichend dosierte und zu einem Selektionsdruck führende Antibiotikatherapie.

2.1.3 Das Problem der NG-Sepsis

2% aller NG erkranken an einer Sepsis (3). Die Letalität der NG-Sepsis wird von verschiedenen Autoren zwischen 30 und 100%, im Durchschnitt mit 40%, angegeben (14,3,31, 9). Diese hohe Sterblichkeit beruht vor allem auf der erschweren Frühdiagnose, welche darauf zurückzuführen ist, daß anfänglich die Symptome der NG-Sepsis uncharakteristisch sind, dann aber ein plötzlicher Ausfall der Organfunktionen folgen kann.

Daher muß jeder Hinweis auf Sepsis als Indikator erwogen werden, wie z.B. krankhaft verändertes Allgemeinbefinden, veränderte Hautfarbe, ein abnehmender Muskeltonus oder Atembeschwerden u.a. Anamnestische Hinweise auf frühzeitigen Blasensprung, Frühgeburt und Operation sollten ebenfalls in die Diagnostik miteinbezogen werden. Labordaten sind meist wenig zuverlässig wegen der langsamen Reaktion des NG auf die Infektion.

2.2

Versuch der Immuntherapie bei der NG-Sepsis

NG besitzen aufgrund ihres IgM-Mangels eine verminderte Abwehr gegenüber gram-negativen Bakterien, während sie durch die plazentagängigen IgG keine wesentlich eingeschränkte Immunlage aufweisen. Gleichzeitig ist bekannt, daß sich seit Einführung der Antibiotika das Erregerspektrum bei NG-Infektionen von primär gram-positiven zu gram-negativen Bakterien verschoben hat. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, daß der physiologischerweise schon vorhandene Immundefekt noch besonders hervorgehoben wird durch Antibiotikatherapie. Die Folgerung daraus wäre, daß Antibiotikamedikation nur sinnvoll ist in Gegenwart eines intakten Abwehrsystems. Somit scheint die Unterstützung der körpereigenen Abwehr durch Substitution der beim NG in vermindertem Maße vorhandenen Ak und Komplementfaktoren zusätzlich zur Antibiotikatherapie von besonderer Bedeutung zu sein.

Immuntherapie	mögliche Nebenwirkungen
Bluttransfusion	Volumenbelastung
Plasmagabe	Volumenbelastung
i.m. IgG-Gabe	keine "Opsonine", verzögerter Wirkeintritt, proteolytische Verluste
i.v. IgG-Gabe	keine "Opsonine"
i.m. IgM-Gabe	kein Komplement, verzögerter Wirkeintritt, proteolytische Verluste

Tab. 3: Möglichkeiten der Immuntherapie einer NG-Sepsis

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit ist die Austauschtransfusion mit frischem Erwachsenenblut. Der Vorteil gegenüber der ausschließlichen Gabe von Immunglobulinen besteht in der Übertragung einer Vielzahl von Abwehrfaktoren, vor allem von Komplementfaktoren und Ak der IgM-Klasse. Außerdem wird zumindest theoretisch eine Keimausschwemmung oder -dilution bewirkt (Tab. 4).

2.2.1

Ziel der Austauschtransfusion bei der NG-Sepsis

Therapieziel	Sepsisbehandlung	Therapie des Immundefekts
Mechanismus	Elimination Dilution	Substitution
Substanz	Toxine, Bilirubin Zellen, Zellprodukte, Ak, Immunkomplexe	Zellen, Zellprodukte Ak, Komplementfaktoren, Koagulationsfaktoren

Abb. 4: Unterstützende Maßnahmen und deren Mechanismen bei der NG-Sepsistherapie.

Zur ATT müssen folgende Einschränkungen gemacht werden

- a) Es ist denkbar, daß bei einem Austausch von etwa 90% des Blutvolumens ein Herauswaschen oder eine Verdünnung von Erregern und Toxinen bewirkt wird. Über diesen Effekt liegen aber bisher keine ausreichenden experimentellen Ergebnisse vor. Es ist jedoch anzunehmen, daß auch noch nach der ATT Erreger von einem Streuherd aus in die Blutbahn gelangen. Unter Umständen kann auch deshalb eine weitere ATT erwogen werden.
- b) Beim NG findet sich eine der Erwachsenen-Norm entsprechende Thrombozytenzahl, gleichzeitig aber ein

deutliches Defizit einer Reihe von Gerinnungsfaktoren. Dennoch ist das Gerinnungssystem des NG insgesamt als hyperkoabel zu bezeichnen (22). Diese gesteigerte Gerinnung kann durch ATT mit ACD-Blut verstärkt werden, was durch eine deutliche Verkürzung der Partiellen Thromboplastinzeit (PTT) und der Thrombinzeit (TT) nach ATT belegt werden kann. Andererseits wird über erfolgreiche Behandlungen von sepsisbedingter disseminierter intravasaler Gerinnung durch ATT mit ACD-Blut berichtet. Klose et al. empfehlen jedoch eine ATT mit Heparinblut. Der Vorteil hiervon liegt in der Unterbrechung des gesteigerten Umsatzes von Gerinnungsfaktoren bei gleichzeitiger Substitution von verbrauchten Gerinnungsfaktoren (22).

- c) Durch die niedrigere O_2 -Affinität von HbA-haltigem Erwachsenenblut gegenüber HbF-reichem NG-Blut wird die Gewebsoxygenierung durch die ATT mit Erwachsenenblut verbessert. Dazu sollte vorzugsweise Warm- bzw. Frischblut verwendet werden, da innerhalb von 3 Tagen der ursprüngliche 2,3-DPG-Gehalt (D-Glycerinsäure-2,3-Diphosphat) in Blutkonserven auf 15% absinkt (17).

2.2.2 Technik der ATT

Eine Blutkonserve (ca. 520 ml = 450 ml Spenderblut und 67,5 ml ACD-Lösung) enthält etwa die doppelte Menge des Blutvolumens eines 3000 g schweren NG, welches 80 - 100 ml/kg Körpergewicht beträgt. Der Prozentanteil des ausgetauschten Blutes läßt sich nach folgender Formel errechnen:

$$\% R = \left[\frac{(V - S)}{V} \right]^n.$$

- R = Anteil an Blut, der nach ATT im Kreislauf bleibt
V = geschätztes Blutvolumen des Kindes in ml
S = pro Austauschschritt entnommene bzw. zugeführte Blutmenge (meist 5 - 10 - 20 ml)
n = Anzahl der einzelnen Blutabnahmen bzw. -gaben.

Es wird empfohlen, etwa mit 160 - 180 ml/kg Körpergewicht auszutauschen, wonach sich aus der Formel ein Austausch von ca. 90% des zirkulierenden Blutvolumens errechnet.

2.2.3 Indikationen zur ATT

Therapeutischer Mechanismus	Ausgetauschte Substanz	Klinische Indikation	Häufigkeit der Indikationsstellung
Elution und Substitution	Bilirubin, intakte Erythrozyten	Rh-Inkompatibilität	Routine
Elution	Toxin	Vergiftung	zunehmend
	Ak, hämolysierte Erythrozyten	Transfusionszwischenfälle	
	toxische Substanzen	Leberzerfallskoma	
	überschüssige Erythrozyten	Polyzythämie	
Elution und Substitution	Toxine, Proteine, Ak, Komplement-, Gerinnungsfaktoren	Verbrennungen	selten
	Toxine, Gerinnungsfaktoren, Lipoproteine	Reye-Syndrom	

Tab. 5: Klinische Indikationen zur ATT (17)

2.2.4 Risiken der ATT

a) mögliche Zwischenfälle während der ATT

- 1) Hypothermie durch unterkühltes Spenderblut
- 2) Kreislaufbelastung durch zu große Volumina
- 3) Luftembolie
- 4) Gefäßspasmen bei Fehllage des Katheters

b) Zwischenfälle aufgrund von Inkompatibilitäten mit dem Spenderblut

- 1) ABO-Inkompatibilität
- 2) Rhesus-Inkompatibilität
- 3) seltenere Isoantikörper des Kell-, Duffy-, Kidd-, Lewis- und Lutheran-Systems,
- 4) Isoagglutinine gegen Leukozyten
- 5) Übertragung von Pyrogenen
- 6) Mikrobielle Kontamination (z.B. Syphilis, Zyto-megalie, Herpes, Hepatitis)

c) Elektrolytverschiebungen bei Verwendung von Konserven-blut

Während der Lagerung der Blutkonserve leidet der Energiestoffwechsel der Erythrozyten, der Kaliumspiegel im Plasma steigt nach 9 Tagen Lagerung an bei gleichzeitigem Absinken des Natriumgehaltes. Die Hypokalziämie durch das im ACD-Blut vorhandene Citrat wird nach der ATT rasch ausgeglichen, da das Citrat schnell metabolisiert wird.

d) Retrolentale Fibroplasie und nekrotisierende Ileocolitis als mögliche Spätfolgen (6, 16)

e) Anaphylaktoide Reaktionen

Anaphylaktoide Reaktionen können ausgelöst werden durch Isoantikörperbildung gegen IgG. In Fällen von IgA-Mangel des Empfängers kommen auch entsprechende Reaktionen gegen Spender-IgA vor. (44)

Insgesamt kann gesagt werden, daß bei kurzer, ordnungsgemäßer Lagerung des Austauschblutes, strengster Kon-

trolle der Blutgruppenkompatibilität und technisch überwachter Austausch-Prozedur das Risiko der ATT im Vergleich zum erhofften therapeutischen Effekt als tragbar bezeichnet werden kann.

2.2.5 Mortalitätsrate

Zahl der ATT	Mortalität	Autoren
875	1.9 %	Boggs et al., 1960
152	0.8 %	Bentley 1960
263	1.5 %	Jablonski 1962
351	0.6 %	Weldon 1968
144	0.7 %	Tan et al., 1976
1785	1.3 %	

Tab.: 6 Mortalitätsraten bei ATT (17).

Die von den verschiedenen Autoren angegebenen Mortalitätsraten bewegen sich zwischen 0.6 und 1.9%. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß in der von Boggs et al. angegebenen Zahl sämtliche Todesfälle, die innerhalb der ersten 6 Std. nach ATT eintraten, enthalten sind. Eine eindeutige Korrelation zwischen ATT und Todesfolge dürfte in allen Fällen schwer aufzustellen sein, da sich die Kinder von vornherein in einem lebensbedrohlichen Zustand befinden.

2.3

Fragestellung

Die für diese Studie gestellten Fragen lauteten:

1. Wie wirken sich Narkose, operative Eingriffe, Intensivbehandlung bzw. postoperative Sepsis und deren Behandlung auf die Immunsituation des operierten Frühgeborenen, Neugeborenen und jungen Säuglings aus?
2. Wird die antiinfektiöse Abwehrfunktion von Patienten dieser Altersgruppen in den genannten klinischen Situationen durch Austauschtransfusionen mit frischem Erwachsenenblut in in-vitro-Untersuchungen nachweislich verbessert?
3. Wird die Letalität der postoperativen Neugeborenen-Sepsis durch die Austauschtransfusion mit Erwachsenenblut im Vergleich zu den bisherigen Therapiemöglichkeiten herabgesetzt?

Zur Klärung dieser Fragen wurde die Abtötungsrate von *Staphylokokkus aureus* und *Serratia marcescens* im "Bakterizidie-Test" (siehe Definition S.2) bestimmt. Außerdem soll anhand der quantitativen Bestimmung charakteristischer Serumproteine ein Vergleich zwischen dem Abtötungsverhalten im Bakterizidie-Test und der Serumkonzentration von Opsoninen und Antikörpern hergestellt werden.

Als Kontrollgruppen werden gesunde Erwachsene, Neugeborene und Säuglinge ohne und mit Operation (prä- und postoperativ) herangezogen. Für den retrospektiven Vergleich der Letalität wird eine Patientengruppe mit postoperativer Sepsis ohne Austauschtransfusion aus früheren Jahren herangezogen.

3

TESTMATERIAL, PATIENTENGUT und METHODEN

3.1

Testmaterial

Accupette Pipets 5 µl, P4518-5	DATE Diagnostics. Inc.
Aqua pro injectione, steril und pyrogenfrei	E. BRAUN, Melsungen
Ammoniumsulfat p.a.	E. BRAUN, Melsungen
Antibiotika-Agar Nr.11	E. MERCK, Darmstadt
Base-Agar, Antibiotika-Agar Nr.5	E. MERCK, Darmstadt
Diaflo Ultrafiltrationsgerät	
Hanksche Lösung, steril	Apotheke d. klinischen Universitätsanstalten München
Zentrifuge: Labofuge	HAERAEUS CHRIST
Liquemin ^R 25.000	HOFFMANN LA ROCHE Grenzach
Makrodex ^R	KNOLL AG, Ludwigshafen
Isotone NaCl-Lösung, steril pyrogenfrei	Apotheke d. klinischen Universitätsanstalten München
Phosphate buffered Saline without Magnesium and Calcium sterile	FLOW LABORATORIES, Bonn
Plastikröhrchen 9 R (14/92)	bezogen über Fa. BOLL, München
Protein-Standard B (Human) zur C3c-Bestimmung	BEHRING-WERKE, Marburg
Rinderserum ORKP 44/45	BEHRING-WERKE, Marburg
Rinder-Serum-Albumin	zur Verfügung gestellt vom PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT der Universi- tät München
Silikonisierte Röhrchen: 2025 Tube 15 x 125 mm style with screw cap	FALCON, USA
Silikonisierte Röhrchen: 2027 Tube 13 x 100 mm	FALCON, USA
Sörensen-Puffer pH 8.0: 94.5 ml einer KH ₂ PO ₄ -Lsg.(9.178%) 5.5 ml einer NaHPO ₄ -Lsg.(11.876%)	

Spektrophotometer, Junior II
Modell 6/20
Standard-I-Nährbouillon
Standard-I-Nähragar
Staphylokokkus aureus A 502
Serratia marcescens

COLEMAN, USA
E. MERCK, Darmstadt
E. MERCK, Darmstadt
Labor Kinderklinik
" "

3.2 Patientengut

3.2.1 Patienten mit ATT nach postoperativer Sepsis

Bei diesen chirurgischen Patienten handelt es sich um FG, NG und SG der v. Haunerschen Kinderklinik der Universität München (siehe Tab.7). In allen Fällen bestand innerhalb weniger Stunden post partum wegen angeborener Mißbildungen die Indikation zu einem chirurgischen Eingriff. Von 11 Patienten wurden 8 innerhalb der ersten 24 Stunden, zwei innerhalb der ersten 10 Tage und ein Kind im Alter von einem Monat operiert.

Es handelte sich um 7 reife NG (5 männlich, 3 weiblich) und um 4 FG (3 männlich, 1 weiblich). In Bezug auf Gewicht und Kopfumfang bestand in keinem Fall eine Dystrophie (alle Werte bewegen sich zwischen der 25. und der 75. Perzentile).

In allen Fällen wurde im Anschluß an die Operation nach einem unterschiedlich langen Intervall eine Sepsis diagnostiziert, davon neun Mal durch eine positive Blutkultur, während in zwei Fällen klinisch und laborchemisch ein dringender Sepsisverdacht bestand ohne positiven bakteriologischen Nachweis. Durch die Blutkultur wurde in 8 von 9 Fällen eine Sepsis durch gram-negative Bakterien und in einem Fall durch gram-positive Bakterien nachgewiesen. Außerdem bestand in einem Fall der nicht durch die Blutkultur bestätigte Verdacht einer Sepsis durch gram-positive Streptokokken der Gruppe B.

Bei 7 Kindern wurde innerhalb von 3 Tagen, in 3 Fällen innerhalb von 10 Tagen und in einem Fall innerhalb von einem Monat postoperativ eine ATT durchgeführt, nachdem sich keine absehbare Besserung durch die alleinige Chemotherapie ergeben hatte. In 8 Fällen war mit Antibiotika der Gruppe I (Cephalotin, Gernepcin), in einem Fall mit Antibiotika der Gruppe I und III (Penicillin) und in einem weiteren Fall ausschließlich mit Penicillin behandelt worden. Bei einem Patienten war keine Antibiotika-Therapie vorausgegangen (siehe auch Definition S. 3).

Pat.-Nr.	G	Geburts- datum	Opera- tions- zeitpunkt	A	Datum der Op	Grund- krankheit	Art der Operation	Sepsis- erreger	BSW	Geb.- Gewicht (g)
B..(1)	m	30.12.76	31.12.76	III	2. 1.77	Ösophagus- atresie	Anastomose	Salmo- nellen	40	3.140
G.S.(2)	f	24.11.76	24.11.76	I, III	26.11.76 28.11.76	Dünndarm- atresie	Resektion	Strep- tokocken Gr. B	40	3.170
H.M.(3)	f	2. 3.77	13. 3.77	I	12.3.77	Megacolon	Resektion	?	40	3.200
H.F.(4)	f	4. 9.76	4. 9.76	I	13.10.76 12.11.76	Colon- atresie	Anus präeter	Pseudo- monas aerue.	32	2.100
M.A.(5)	m	8.12.76	8.12.76	I	8. 1.76	Gastro- chisis	Resektion Anus prae- ter	Entero- bact. cloacae	38	2.800
O..(6)	m	20. 1.77	24. 1.77	I	25. 1.77 5. 2.77	Dünndarm- perforat.	Resektion	E.coli	26	1.550
S.M.(7)	m	31. 1.77	1. 2.77	I	2. 2.77 3. 2.77	Dünndarm- atresie	Dünndarm- resektion	E.coli	34	2.620
S.A.(8)	m	8. 4.76	10.10.76	I	24.10.76 26.10.76	Anal- atresie	Sigmoid- resektion	Serratia marcesc.	38	3.000
W.F.(9)	m	22.9.76	22. 9.76	Ø	1.10.76	Ösophagus- atresie	Gastro- stomie	Staph. aureus	32	1.650
Y.M.(10)	m	30.10.76	7. 1.77	I	10. 1.77	Megacolon	Anus präeter	Salmon. Gr.B	40	3.710
M.W.(11)	m	24.6.77	24. 6.77	I	28.6.77	Analatre- sie	Anus präeter	E.coli	39	2.900

Tab. 7: Klinische Daten von 11 Patienten mit postopera-
tiver Sepsis, behandelt mit Austauschtransfusion(en)
G = Geschlecht, A = Antibiotikagruppe (siehe Text)
Ø = keine Antibiotikamedikation

3.2.2 Chirurgische Kontrollpatienten ohne Sepsis und ohne ATT (siehe Tab. 8).

Eine kontrollierte Studie unter Gegenüberstellung zweier Gruppen von Sepsispatienten mit und ohne Therapie durch ATT wurde aus ethischen Gründen nicht durchgeführt. Aus diesem Grunde besteht die Kontrollgruppe nicht aus postoperativen Sepsispatienten, sondern es handelt sich um chirurgische Patienten der entsprechenden Altersgruppe ohne Sepsis. Zweck der Untersuchung war hier sowohl der Vergleich mit den postoperativen Sepsisfällen als auch eine Kontrolle der bakteriziden Serumaktivität vor und nach der Operation. Da es sich hier nicht immer um akute Operationsindikationen handelte, sind 18 von 19 chirurgischen Kontrollpatienten über 2 Monate alt, nur in einem Fall handelt es sich um ein NG von 24 Stunden.

3.2.3 Erwachsene Kontrollpersonen

Es handelt sich um gesunde Erwachsene, die Spender der Kontrollgranulozyten I und II (siehe Tab. 26, 27, 33) waren und von denen auch das entsprechende Kontrollserum stammte. Die beiden Kontrollen wurden im Laufe der Versuche ausgewählt, da sie gut reproduzierbare und vergleichbare Phagozytosequotienten aufwiesen.

3.2.4 Postoperative Sepsisfälle ohne ATT (Jahrgänge 1972 - 75, siehe Tab. 9)

Von den postoperativen Sepsisfällen ohne ATT aus den Jahren 1972 - 75 existieren keine Testseren mehr. Es kann hier nur die Letalitätsrate verglichen werden. Von diesen 24 Kontrollpatienten ohne ATT wurden 11 am Tage der Geburt, 3 am folgenden und 4 nach zwei Tagen operiert. Die restlichen 5 Patienten wurden erst mit 1 - 4 Wochen post partum operiert. Von den 24 Kindern überlebten nur 3, dies entspricht einer Letalitätsrate von 87,5%.

Pat. Nr.	Alter bei Op.	G	Geb.-Datum	Op-Datum	Diagnose
A.S.(1)	3 Mo.	f	13. 1.77	19.3.77	Lippenspalte
B.V.(2)	7 Mo.	m	19. 8.76	27.4.77	Li.-Kiefer- Gaumenspalte
B.A.(3)	3 Mo.	m	8.12.76	5.3.77	Ileus
G.K.(4)	5 Mo.	m	12. 1.77	3.6.77	Li.-Kiefer- Gaumenspalte
H.F.(5)	12 Mo.	m	12. 6.76	13.6.77	Li.-Kiefer- Gaumenspalte
H.U.(6)	2 Mo.	m	13. 4.77	13.6.77	Leistenhernie
K.C.(7)	3 Mo.	f	4.12.76	23.3.77	Hiatushernie
K.M.(8)	8 Mo.	m	9. 9.76	4.5.77	Lymphangiom re.Unterschen- kel
M.-(9)	4 Mo.	m	12.12.76	26.4.77	Lippenspalte
M.A.(10)	8 Mo.	m	11.10.76	13.6.77	Lymphangiom Thorax
M.C.(11)	3 Mo.	m	6. 3.77	21.6.77	Li.-Kiefer- Gaumenspalte
R.F.(12)	3 Mo.	m	19. 1.77	2.5.77	Hydrocele re. Testis
R.G.(13)	3 Mo.	f	28. 2.77	25.5.77	Lippenspalte
S.R.(14)	12 Mo.	m	23. 2.76	2.3.77	Lippenspalte
T.W.(15)	4 Mo.	m	13.12.76	25.4.77	Lippenspalte
W.T.(16)	2 Mo.	f	7. 1.77	31.3.77	Nabelhernie
Z.A.(17)	7 Mo.	f	13. 8.76	2.5.77	Leistenhernie
Z.-(18)	2 Mo.	m	29. 1.77	2.4.77	Meningomyelo- zele
Z.C.(19)	24 h.	f	14. 4.77	15.4.77	Teratom

Tab. 8: 19 chirurgische Kontrollpatienten ohne Sepsis
und ohne ATT (siehe 3.2.2)
G = Geschlecht

Pat.-Nr.	G	Geburts- datum	Zeitpunkt d. Op.	Diagnose d. Grundkrankheit	Sepsisdiagnose klinisch bzw. Blutkultur	Reife bzw. Geburts- gewicht(g)	Verlauf (gestorben +) (lebt)
Ab (1)	f	17.10.73	19.10.73	Dünndarmatresie	E.coli	2.600	<u>lebt</u>
Ba (2)	m	27. 3.75	29. 3.75	Analatresie	klinisch	FG	14.4.75 +
Bl (3)	m	24. 8.73	13. 9.73	Ösophagusatresie	klinisch	FG	24.9.75 +
Be (4)	f	17. 7.74	18. 7.74	Ösophagusatresie	klinisch	FG	24.7.74 +
Do (5)	m	13. 7.75	17. 7.75	Megacolon	E.coli	3.250	3.8.75 +
Hö (6)	m	27. 5.74	27. 5.74	Omphalozele	klinisch	2.600	12.6.74 +
Kl (7)	m	24. 7.76	24. 7.76	Analatresie	klinisch	3.100	<u>lebt</u>
Kl (8)	m	31. 7.74	31. 7.74	Omphagozele Li.-Kiefer- Gaumenspalte	Klebsiella	3.000	29.9.74 +
Kr (9)	m	2. 2.74	4. 2.74	Ösophagusatresie	klinisch	1.700	10.3.74 +
Ie (10)	m	22. 3.74	27. 6.74	Gastrochisis	klinisch	1.800	29.3.74 +
Me (11)	f	27. 6.74	27. 6.74	Gastrochisis	klinisch	1.880	29.6.74 +
Ni (12)	f	10. 8.73	11. 8.73	Volvulus	klinisch	2.400	12.9.73 +
Pe (13)	f	19.11.73	20.11.73	Analatresie	Pseudomonas	2.400	6.12.73 +
Pl (14)	m	27. 9.74	27. 9.74	Gastrochisis	Pseudomonas	3.000	25.11.74 +
Sch (15)	f	17. 3.74	19. 3.74	Mekoniumpulcus	klinisch	4.050	23. 3.74 +
Sch (16)	f	24. 4.75	24. 4.75	Gastrochisis	klinisch	2.400	19. 5.75 +
Schö(17)	m	21. 9.73	25. 9.73	Ösophagusatresie	klinisch	2.700	28. 9.73 +

Tab. 9: Klinische Daten zu 24 Fällen von postoperativer Sepsis ohne ATT aus den Jahren 1973 bis 1976 (Fortsetzung siehe Tab. 9a)

Pat.-Nr.	G	Geburts- datum	Zeitpunkt d. Op	Diagnose d. Grundkrankheit	Sepsisdiagnose klinisch bzw. Blutkultur	Reife bzw. Geburts- gewicht(g)	Verlauf (gestorben +) (lebt)
So (18)	f	10. 3.76	10. 3.76	Omphalozele	Candida	2.690	14. 5.76 +
St (19)	m	9. 8.73	9. 8.73	Gastrochisis	klinisch	2.100	12. 9.73 +
Ta (20)	m	28.10.74	28.10.74	Ösophagus- und Analatresie	Pseudomonas	3.000	25.11.74 +
Tu (21)	m	27. 5.74	27. 5.74	Omphalozele	Klebsiella	2.650	11. 6.74 +
Wa (22)	m	14.10.73	21.10.73	Dünndarmatresie	E.coli	2.300	1.11.73 +
We (23)	m	15. 5.74	29.5. 74	Duodenalstenose	Klebsiella	2.800	lebt
Wi (24)	m	22. 1.74	18.2. 76	Ileus	klinisch	FG	17. 5.76 +

Tab. 9 a: Klinische Daten zu 24 Fällen (Fall 18 - 24) von postoperativer Sepsis ohne ATF aus den Jahren 1973 - 1976 (G = Geschlecht)

Es handelt sich um 16 männliche und 8 weibliche NG und FG, von denen 17 innerhalb der ersten 2 Tage post partum, weitere 5 innerhalb der ersten 5 Tage und 2 mit drei Wochen operiert wurden. Die Sepsisdiagnose wurde in zehn Fällen durch positive Blutkultur gestellt, wobei es sich mit der Ausnahme einer Candida-Sepsis in allen Fällen um gram-negative Erreger handelte. Bei den restlichen Kindern bestand dringender klinischer Sepsisverdacht.

3.1.5 Spenderblut

Das Spenderblut für die ATT wurde z.T. vom Blutspendendienst des Bayrischen Roten Kreuzes bezogen, z.T. stellte sich in eiligen Notfällen gesundes Klinikpersonal als Spender zur Verfügung (siehe Tab. 10).

Pat.-Nr.	Nr. der ATT	Konserven- blut-Nr.	Hausspender I - VII	Alter des Blutes
B.-. (1)	1. ATT		I, II	Warmblut
G.S. (2)	1. ATT	954 335		Warmblut
	2. ATT	822 981		3 Tage
H.M. (3)	1. ATT	105 922		Warmblut
	2. ATT	804 836	Frischblut	
H.T. (4)	1. ATT	820 042	III	Frischblut
	2. ATT	822 278		3 Tage
M.A. (5)	1. ATT			Warmblut
O.-. (6)	1. ATT	900 348		IV
	2. ATT			
S.M. (7)	1. ATT		II	Warmblut
	2. ATT		V	Warmblut
S.A. (8)	1. ATT		V	Warmblut
	2. ATT	953 046		Warmblut
W.T. (9)	1. ATT	802 440		keine Angabe
Y.M.(10)	1. ATT		VI	Warmblut
M.W.(11)	1. ATT	95726 und	VII	Warm- und Frischblut

Tab.:10: Angaben über das bei 17 ATT verwendete Spenderblut (Blutbezeichnungen siehe Definition)

3.2.6 Postoperative Sepsisfälle mit ATT aus den Jahren 1974 - 77.

Die in Tab. 11 zusammengestellten Fälle konnten keiner experimentellen Untersuchung zugeführt werden. Es handelt sich um 6 männliche und 2 weibliche FG und NG. In vier Fällen wurde die Sepsisdiagnose durch positive Blutkultur gestellt, wobei bei zwei Patienten gram-negative, in einem Fall gram-positive Erreger und in einem weiteren Fall Candida nachgewiesen wurden. Die Behandlung bestand in Antibiotika-Therapie mit anschließender ATT. Bei diesen Patienten ergab sich eine Letalitätssrate von 63 %.

Pat.-Nr.	G	Geb.-Dat.	ATT-Datum	Diagnose der Grund- krankheit	Erreger bzw. Sepsis- verdacht	Gewicht g	SSW	Verlauf Gestor- ben + (lebt)
Asch(1)	m	3. 5.76	12.10.76 22.10.76	Ösophago- gastro- ösophage- sies	Candida	2.690		lebt
Kir (2)	m	27.2.75	10. 4.76	Gastro- chisis	Sepsis- verdacht	3.350	41	+
Klei(3)	f	23.7.76	30. 8.77 20.9. 77	Ösophago- atresie	"	2.940		lebt
Obe (4)	m	22.11.76	14.5.76	Gastro- chisis	E.coli	2.300	36	+
Ro (5)	m	7.11.75	7.11.75	Ösophago- atresie	Strep- tococc.	3.800		+
Spe (6)	f	22.11.76	Dez. 76	Gastro- chisis	Sepsis- verdacht	1.890	37	+
Wil (7)	m	20.2.74	6. 4.74	Mega- colon	"	2.860		lebt
Wun (8)	m	2. 7.76	27. 7.76	Ileum- perfora- tion	E.coli	1.700	26	+

Tab. 11: Klinische Daten zu 8 Fällen von postoperativer Sepsis mit ATT aus den Jahren 74 - 77 (G = Geschlecht)

3.3 Methoden

3.3.1 Bakterizidie-Test (siehe Definitionen, S. 2)

Das Kriterium für die Auswertung des Bakterizidie-Tests ist die endgültige Abtötung von Bakterien als Folge des Zusammenspiels von Serumfaktoren, Phagozytose und intra-granulozytärer Bakterizidie (siehe Abb. 7). Die aus diesem Test getroffene Aussage ist jedoch abhängig davon, welche der Abwehrfaktoren von der zu untersuchenden Person stammt.

Direkter Test (Bakterizidie-Test)

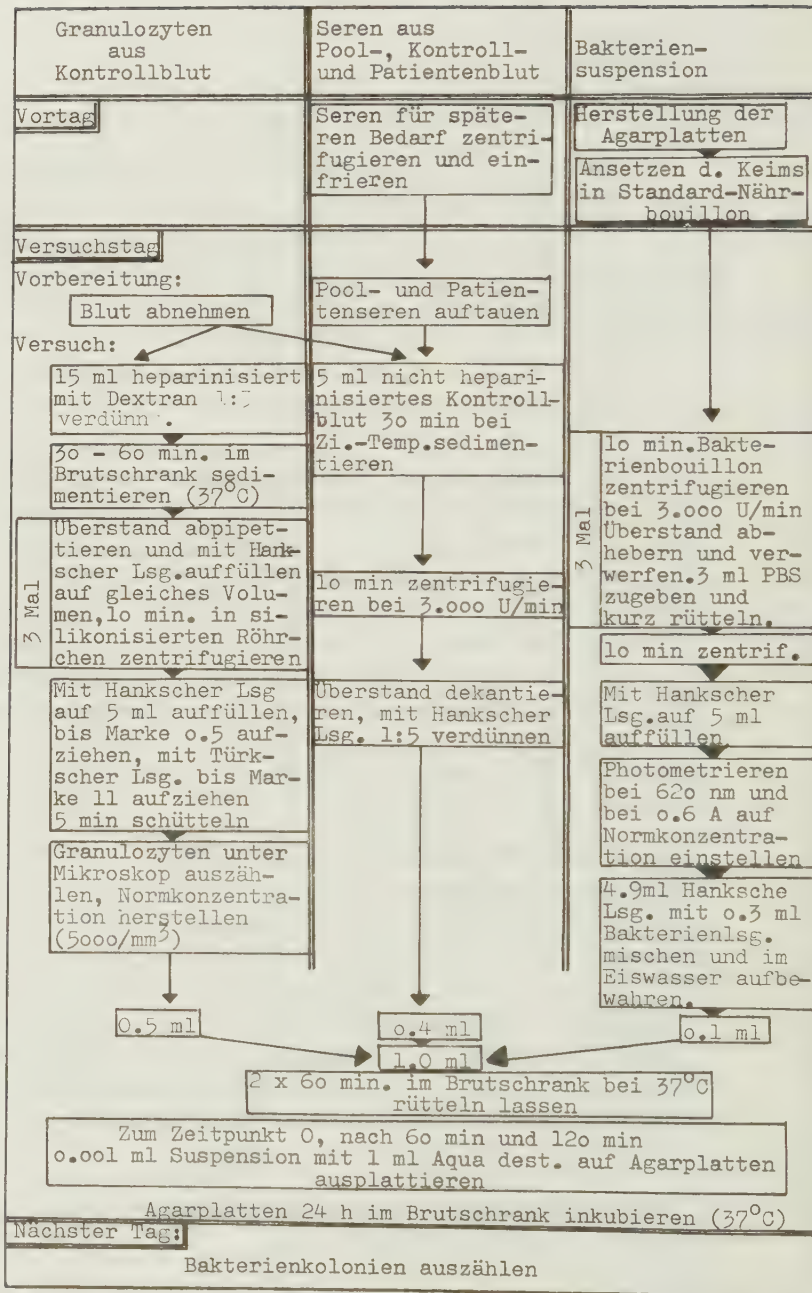
Bei diesem Test stammen alle humoralen und zellulären Abwehrfaktoren von der Versuchsperson. Er konnte jedoch aus technischen Gründen nur in zwei Fällen durchgeführt werden. Zum einen waren die zur Verfügung gestellten Blutmengen aus der ATT zu gering, um eine ausreichende Granulozytenzahl zu isolieren. Zum anderen müssen Granulozyten wegen der geringen in-vitro Halblebenszeit (ca. 6 Std.) innerhalb kürzester Zeit getestet werden. Ein schnelles Arbeiten mit den Granulozyten scheiterte zum Teil auch daran, daß vor dem Test erst noch die hohen Antibiotika-Konzentrationen aus dem Patientenserum eliminiert werden mußten.

Indirekter Test (Serumbakterizidie-Test)

Bei diesem Test stammen nur die Serumfaktoren vom zu untersuchenden Patienten, die Wirkung der zellulären Bestandteile wird hier nicht berücksichtigt, da die Granulozyten als Indikatorzellen von einer erwachsenen Kontrollperson entnommen werden. Da davon ausgegangen wird (siehe S. 16), daß der Immundefekt des NG vor allem auf einem Defizit der humoralen Faktoren beruht, dürfte dieser Test eine spezifische Aussagekraft besitzen.

3.3.1.1 Schema des Versuchsablaufs

Der Versuchsablauf im Bakterizidie-Test ist schematisch in Tab. 12 dargestellt.



Tab. 12: Schema des Versuchsablaufs

3.3.1.1.1 Herstellung einer Granulozytensuspension

Alle Vorgänge laufen unter streng sterilen Bedingungen ab.

Nach Blutabnahme von etwa 20 ml. werden am Versuchstag 15 ml heparinisiertes Venenblut (5 E Liquemin^R/ml Blut) mit Macrodex^R im Verhältnis 3 : 1 (1 Teil Blut und 2 Teile Macrodex) vermischt und in silikonisierten Meßzylindern im Brutschrank bei 37°C zur Sedimentation aufbewahrt. Nach 30 - 60 min. haben sich die Erythrozyten etwa auf die Hälfte des Gesamtvolumens abgesetzt. Der Überstand wird abpipettiert, das Sediment in einem Zentrifugenglas 3 Mal gewaschen, d.h. nach jeder Zentrifugation wird der Überstand verworfen und durch Hanksche Lösung ersetzt. Die Suspension wird vor jedem Zentrifugieren auf dem Rüttler gut vermischt. Das Supernat besteht überwiegend aus Lymphozyten, das Sediment aus Granulozyten, Monozyten und aus vereinzelt Erythrozyten.

Nach der dritten Zentrifugation wird das Sediment mit Hankscher Lösung auf 5 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird auch zur Zählung der Granulozyten verwendet. Hierbei wird die Granulozytensuspension in der Leukozytenzählpipette bis zur Markierung 0.5 aufgezogen, anschließend noch Türksche Lösung als Färbemittel bis Marke 11. Nach 5 Minuten Schütteln wird diese Lösung in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Anzahl der in vier Quadranten ermittelten Leukozyten wird mit dem Faktor 2.5×10^5 multipliziert, dadurch erhält man die Leukozytenzahl/ml-Suspension. Da die Leukozytenanzahl zum interindividuellen Vergleich in den Versuchsansätzen gleich eingestellt sein muß, wird die Suspension bei einer zu hohen Leukozytenzahl entsprechend verdünnt und bei einer zu niedrigen Zahl ein weiteres Maß zentrifugiert und die überzählige Menge an Hankscher Lösung abpipettiert.

In dieser Versuchsreihe wurde eine Granulozytenzahl von 5×10^6 /ml Suspension zugrunde gelegt. Im Trypanblau-Ausschluß-Test wurden über 95% lebende Granulozyten nachgewiesen.

3.3.1.1.2 Herstellung einer Bakteriensuspension (*Staphylokokkus aureus* oder *Serratia marcescens*).

Es wurden sowohl *Staphylokokkus aureus* als auch *Serratia marcescens* als Testbakterien eingesetzt. Beide Erreger werden überwiegend durch die Kooperation von humoralen und zellulären Faktoren eliminiert (Ak-abhängige cytotoxische Reaktion). Im Gegensatz dazu werden beispielsweise *E.coli* und *Klebsiella*-Spezies durch rein humorale Mechanismen abgetötet (13).

Der Keim wird am Vorabend des Versuchstages in einer Standard-Nährbouillon frisch angesetzt und unter Standardbedingungen bebrütet. Am Versuchstag wird diese Lösung drei Mal gewaschen, d.h. zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wird der Überstand verworfen und durch das gleiche Volumen physiologischer NaCl-Lösung ersetzt. Nach der dritten Zentrifugation wird mit Hankscher Lösung auf 3 ml aufgefüllt und anschließend im Photometer bei 620 nm gegen Hanksche Lösung als Referenzwert die optische Dichte bestimmt. Die Lösung wird solange mit Hankscher Lösung verdünnt, bis der Photometer einen Wert von 0.6 Absorption anzeigt.

0.3 ml dieser Bakteriensuspension werden nun mit 4.9 ml Hankscher Lösung auf 5.2 ml aufgefüllt, was der empirisch gefundenen Konzentration von ca. 5×10^7 Bakterien/ml entspricht. Um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern, wird die Suspension bis zur endgültigen Verwendung in Eiswasser im Kühlschrank bei $4 - 6^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt.

3.3.1.1.3 Herstellung des Serum-Ansatzes

Unheparinisiertes Vollblut wird zur Serumgewinnung nach Blutentnahme bei Zimmertemperatur 30 - 60 min stehengelassen.

Anschließend wird das sedimentierte Blut 10 min bei 3.000 U/min zentrifugiert und das so gewonnene, nicht hämolytische, Serum in kleine Volumina von etwa 0.5 ml steril aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

Nach Auftauen bei Bedarf wird das Serum mit Hankscher Lösung 1 : 5 verdünnt.

3.3.1.1.4 Verdünnung der verschiedenen Testzusätze

	Granulozyten	Serum	Bakterien
Physiologische Konzentration	$5 \times 10^6/\text{ml}$	unverdünnt	--
Testansatz	$2.5 \times 10^6/\text{ml}$	12.5-fach verdünnt	$5 \times 10^6/\text{ml}$
Zugabe der entnommenen Probe (0.001 ml) zu 1 ml Aqua dest.	$2.5 \times 10^3/1.001 \text{ ml}$		$5 \times 10^3/1.001 \text{ ml}$

Tab. 13: Verdünnungsverhältnisse in den Testansätzen

Aus Tab. 13 wird deutlich, daß das Verhältnis von Bakterien zu Granulozyten 2 : 1 ist.

3.3.1.2 Versuchsansatz

Die Serumbakterizidie der zu untersuchenden Personen wird mit jener der Kontrollperson (evt. auch des Spenders) und dem Poolserum (bei -20°C tiefgefrorenes Serum von mehr als fünf gesunden Erwachsenen) verglichen (siehe Tab. 14). Die Granulozyten stammen von der Kontrollperson.

Außerdem wird die ausschließliche Serumbakterizidie ohne Granulozytenmitwirkung ebenfalls mit allen anderen Seren verglichen. Dies ist hauptsächlich wichtig zum Nachweis der Wirkung von Antibiotika im Serum, welche das Ergebnis durch Vortäuschen eines erhöhten Abtötungsquotienten (siehe Definitionen S.2) verfälschen können.

Schließlich werden auch die Kontrollgranulozyten ohne Serum routinemäßig untersucht, um methodisch-präparative Unregelmäßigkeiten auszuschließen.

Das Vorkommen von Bakterien im Patientenblut oder die bakterielle Kontamination von Testsubstanzen wird durch einen Testansatz ohne die Zugabe von 0.1 ml Bakterien-suspension kontrolliert.

Die Ansätze bestehen alle aus 1 ml Lösung, fehlende Ansatzmengen werden mit Phosphatpuffer ausgeglichen. Dieses Testvolumen wird in silikonisierten Röhrchen im Brutschrank bei 37°C mit konstanter Geschwindigkeit unter Standardbedingungen gerüttelt. Silikonisierte Röhrchen werden hier (wie auch bei der Sedimentation des Vollblutes im Brutschrank und bei der anschließenden Zentrifugation) benutzt, um ein Ansetzen der Zellen an die Wandung zu vermeiden. Durch das Rütteln werden die Granulozyten in einer gleichmäßigen Bewegung gehalten, wodurch ein Absinken (Sedimentation) der Zellen verhindert und ein optimaler Kontakt aller Testbestandteile erzielt wird.

Untersuchungsprinzip	Zusammensetzung der Versuchsansätze				Gesamt-Test-Volumen
	Granulozyten	Bakterien	Serum	Phosphat-Puffer	
Testpersonenspezifische Serumbakterizide (im Fall der Kontrollperson Serumbakterizide und intrazelluläre Bakterizide):	0.5 ml	0.1 ml	0.4 ml Poolserum		1 ml
	0.5 ml	0.1 ml	0.4 ml Kontrollserum		1 ml
	0.5 ml	0.1 ml	0.4 ml Patientenserum		1 ml
Vergleich von standardisiertem Serum (Poolserum) und Erwachsenenserum (Kontrollserum) mit dem Patienten-serum unter Verwendung von Kontrollgranulozyten.					
Anschluß bzw. Ermittlung ausschließlich serum-abhängiger Unterschiede (Serumfaktoren, Serumzusätze z.B. Antibiotika)	-	0.1 ml	0.4 ml Poolserum	0.5 ml	1 ml
	-	0.1 ml	0.4 ml Kontrollserum	0.5 ml	1 ml
	-	0.1 ml	0.4 ml Patientenserum		1 ml
Vergleich der Seren ohne zelluläre Bestandteile					
Nachweis und Anschluß von Bakterienämie bei Patienten oder von testbedingter bakterieller Kontamination	0.5 ml	-	0.4 ml Patientenserum	0.1 ml	1 ml
Ansatz ohne Bakterienzugabe:					
Phagozytose und intragranulozytäre Bakterizide der zellulären Bestandteile.	0.5 ml				
Ansatz ohne Serumzugabe					
	0.5 ml	0.1 ml	-	0.3 ml	1 ml

Tab. 14: Ermittlung der testpersonenspezifischen Bakterizide unter getrennter Berücksichtigung von zellulären und humoralen Bestandteilen.

Vor Einbringen in den Brutschrank (Zeitpunkt 0), sowie nach 60 und 120 min werden jeweils 0.001 ml des Phagozytoseansatzes mit einer Mikroliterpipette abgenommen und zu 1 ml Aqua dest. gegeben. Aqua dest. hat in diesem Fall die Aufgabe, die Lyse der Granulozytenmembranen zu erleichtern (52), um so auch intrazellulär noch weiterlebende Bakterien nachzuweisen. Von dieser - nun 1000-fach verdünnten Suspension - werden mit einer Blutzuckerpipette 0.05 ml auf einer Agarplatte verstrichen.

Die Auszählung der Bakterienkolonien erfolgt nach 24 Std. Inkubation im Brutschrank (Standardbedingungen). Es wird eine Anfangskonzentration (k_0) zum Zeitpunkt 0 von rund 200 - 250 Bakterienkolonien gezählt. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 2×10^4 kann auf die effektive Bakterienkonzentration im Testansatz geschlossen werden.

3.3.1.3 Anwendung des Bakterizidie-Tests für unterschiedliche Fragestellungen.

Mit dem beschriebenen Testsystem sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

- a) Vergleich der bakteriziden Aktivität vor und nach ATT bei postoperativen Sepsisfällen
- b) Vergleich der bakteriziden Aktivität vor und nach Operation bei chirurgischen Kontrollpatienten.
- c) Verlust der bakteriziden Aktivität von Spenderblut durch Lagerzeiten von 2 - 48 Stunden.
- d) Überprüfung der bakteriziden Aktivität nach Antibiotika-Eliminierung aus dem Testserum.

3.3.2 Die Eliminierung von Antibiotika aus dem Serum

Um die Effizienz der verschiedenen Methoden zur Antibiotika-Eliminierung aus dem Serum zu testen, wurde ein oxacillinhaltiges Serum als Standardserum verwandt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Labor Prof. Dr. Adam, Universitäts-Kinderklinik). Die Proteinbindung von Oxacillin beträgt ca. 90% (55).

3.3.2.1 Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration wird das antibiotikahaltige Serum mit einem Stickstoffdruck von 4 bar durch eine Membran gepreßt, deren Poren Moleküle mit einem Molekulargewicht (MG) kleiner als 50.000 passieren lassen. Zurückgehalten werden also alle immunologisch wichtigen Serumproteine, wie Komplementfaktoren (MG 110 000 bis 240 000), Immunglobuline (MG 150 000 bis 900 000) und auch Albumin (MG 69 000), welches den Hauptteil der eiweißgebundenen Antibiotikafraktion trägt.

Zur Herabsetzung der Proteinbindung der Antibiotika über das Massenwirkungsgesetz wird das Serum 20-fach mit Phosphatpuffer verdünnt.

$$K_{eq} = 1 = \frac{[P] \times [A]}{[PA]}$$

nach 20-facher Verdünnung vor Gleichgewichtseinstellung:

$$= \frac{[P/20] \times [A/20]}{[PA/20]}$$

nach Gleichgewichtseinstellung:

$$K_{eq} = 1 = \frac{[P/14] \times [A/14]}{[PA/200]}$$

K_{eq} = Gleichgewichtskonstante

$[P]$ = ursprüngliche Proteinkonzentration

$[A]$ = Konzentration an freiem Antibiotikum

$[PA]$ = Konzentration an eiweißgebundenem Antibiotikum

So ist beispielsweise bei einer ursprünglichen Proteinbindung von 50% nach 20-facher Verdünnung und Gleichgewichtseinstellung zwischen Protein und freiem Antibiotikum einerseits und gebundenem Antibiotikum andererseits der Anteil des gebundenen Antibiotikum nur noch $1/14$ der des ungebundenen, also ca. 7%. Das ungebundene Antibiotikum kann theoretisch eliminiert werden, d.h. bei zweimaliger Filtration verbliebe ein Rest von weniger als 1%. Die Verdünnung erfolgt mit Hankscher Lösung. Der einzelne Filtrationsvorgang beträgt rund eine Stunde und wird im Kühlraum bei $4 - 6^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

3.3.2.2 Globulinfällung mit Ammoniumsulfat

Auch bei der Fällungsmethode wird das Serum zur Herabsetzung der Antibiotikum-Protein-Bindung 20-fach mit Phosphatpuffer verdünnt und 10 min im Kühlraum zur Gleichgewichtseinstellung auf dem Magnetrührer gerührt. Anschließend werden zu 10 ml Lösung (0.5 ml Serum und 9.5 ml Phosphatpuffer) 3.9 gr Ammoniumsulfat (60% Sättigung) im Laufe von einer Stunde zugeführt. Bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration wird nur ein Teil der Albumine, aber der größte Teil der Globulinfraktionen gefällt. Die Lösung wird weitere 10 min im Kühlraum gerührt und anschließend 10 min bei 5.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Der Niederschlag wird in 0.5 ml Hankscher Lösung aufgenommen und gelöst.

Der Fällungsvorgang wird anschließend wiederholt. Auch mit dieser Methode verbleiben theoretisch nur noch 1% des Antibiotikum im Restserum.

3.3.2.3 Dialyse

Bei der Dialyse diffundieren kleinere Moleküle aus dem das Serum enthaltenden Kompartiment durch die semipermeable Dialysemembran in die Pufferlösung. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz läßt sich auf diese Weise die Konzentration des gebundenen Antibiotikum vermindern, je nach Volumen des Puffers. Das Gleichgewicht wird weiter verschoben zu einer noch geringeren Antibiotikakonzentration im Serum, wenn nicht gegen Puffer, sondern gegen eine antibiotikum-bindende Lösung dialysiert wird, z.B. Rinderserum-Albumin-Lösung. Zur besseren Handhabung (pipettieren etc.) wird das Serum (0.5 ml) auf 2.5 ml mit Phosphatpuffer verdünnt und im Dialyseschlauch 48 Stunden lang im Kühlraum gegen 250 ml 5%ige Rinderserum-Albumin-Lösung in Phosphat-Puffer gerührt.

3.3.3 Hemmhoftest

Die Antibiotikum-Konzentration im Serum vor und nach Eliminierung wurde mit dem Hemmhoftest untersucht. Träger ist dabei ein 2-Schichten-Agar, bestehend aus einem Base-Agar und einem "Antibiotikum-Agar", dem 2% *Sarcina lutea* beigelegt werden. Die in dem erstarrten Agar ausgestanzten Löcher von 1 cm Durchmesser werden mit 0.1 ml des verdünnten Serum gefüllt. Es werden Verdünnungen von 1:500, 1:250, 1:50 und 1:10 verwendet, hergestellt aus Rinderserum und Sörensen-Puffer im Verhältnis 1:2. Nach 24 Stunden Inkubation werden die Durchmesser der Hemmhöfe gemessen und mit einer Eichkurve aus bekannten Antibiotika-Konzentrationen verglichen.

3.3.4 Quantitative Bestimmung von Serumproteinen (Immunglobulinen)

3.3.4.1 Durchführung

Die Konzentrationen von IgG, IgM, IgA und G3c werden mit Hilfe von Tri-Partigen-Immundiffusions-Platten nach der Methode von Mancini bestimmt.

Zur Herstellung einer Eichkurve werden drei käufliche Testseren unterschiedlicher Proteinkonzentration verwendet.

3.3.4.2 Anwendung der quantitativen Serumproteinbestimmung

- a) Vergleich der Proteinkonzentration vor und nach ATT bei postoperativen Sepsisfällen
- b) Vergleich der Serumproteinkonzentration bei Kontrollen vor und nach Operation
- c) Überprüfung der erhaltenen Proteinkonzentration nach Antibiotikum-Eliminierung.
- d) Bestimmung der Proteinkonzentration nach unterschiedlicher Lagerdauer des Serum

3.3.5 Elektrophoretische Bestimmung von Serumprotein

Die elektrophoretische Trennung von Serumproteinen wurde vom Labor der Kinderklinik durchgeführt auf Acetatfolie unter Verwendung des Farbstoffs Ponceau-Rot.

3.3.6 Trypanblau-Färbung zur Sichtbarmachung von membrangeschädigten Granulozyten

Zu 0.5 ml Zellsuspension (Zellverdünnung $1 - 2 \times 10^5$ Zellen/ml) werden 0.1 ml einer 0.4%igen Trypanblau-Lösung gegeben und vermischt. Nach 5 Minuten Stehenlassen wird diese Suspension in einer Leukozytenpipette aufgezogen, geschüttelt und in der Neubauerkammer mikroskopisch gezählt. Man geht davon aus, daß nicht-gefärbte Granulozyten, die den Farbstoff nicht aufnehmen, funktionsfähig sind, gefärbte dagegen membrangeschädigt sind und den Farbstoff eindringen lassen.

3.3.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verwendet.

Bei unseren Untersuchungen von postoperativen Sepsisfällen vor und nach ATT, den chirurgischen Kontrollen vor und nach Operation, wie auch bei den Patientenseren vor und nach Dialyse handelt es sich um paarige Stichproben, d.h. die "Nichtbehandlung" und die "Behandlung" wurde an der gleichen Versuchsperson bzw. am gleichen

Serum durchgeführt.

Man geht von der Nullhypothese aus, welche besagt, daß zwischen den Vergleichswerten kein Unterschied besteht. Diese wird abgelehnt, wenn sie mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ($\alpha \leq 0.01$) nicht zutrifft. Eine statistische Auffälligkeit liegt vor, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($\alpha \leq 0.05$) abgelehnt werden kann. Beim Wilcoxon-Test ist einerseits das Vorkommen des Fehlers 2. Art möglich, nämlich die Beibehaltung der Nullhypothese bei tatsächlicher Differenz der Werte, andererseits setzt er keine Normalverteilung voraus.

Die Differenzen der Phagozytosequotienten werden dem Absolutbetrag nach geordnet. Die Summe der Ränge der negativen (selteneren) Differenzen wird als Prüfmaß (Rangsumme) verwandt und muß kleiner (bzw. gleich sein) als der kritische Wert, welcher der Anzahl der Versuchspersonen bzw. -seren zugeordnet ist.

4

ERGEBNISSE

4.1

Antibiotika-Eliminierung

Bei den ATT-Patienten handelt es sich mit einer Ausnahme um antibiotisch vorbehandelte Fälle. Erst nach Eliminierung des antimikrobiellen Effektes der im Serum befindlichen Antibiotika sind die im Bakterizidietest ermittelten Abtötungsraten für die Fragestellung verwendbar.

4.1.1

Ultrafiltration

Es läßt sich errechnen, daß nach Ultrafiltration noch eine Antibiotika-Konzentration von ca. 7%, nach zweimaligem Passieren ein Gehalt von ca. 1% vorhanden sein müßte (siehe 3.3.2.1). Die γ -Globulin-Konzentration im Serum beträgt nach dieser Behandlung 54 - 76% der ursprünglichen (siehe Tab. 16), der Abtötungsquotient im Vergleich zum unbehandelten Serum ist noch ca. 80% (Tab. 18). Die gemessene Antibiotika-Konzentration nach zweimaligem Ultrafiltrieren liegt bei 14% (Tab. 17).

Proteinfraktion	Konzentration vor Filtration	Konzentration nach Filtration
Albumin	60 %	64 %
α_1 -Fraktion	3.3%	2.9%
α_2 -Fraktion	9.7%	10.7%
β -Fraktion	14.7%	10.9%
γ -Fraktion	12.3%	11.4%

Tab. 15: Abnahme der Serumproteinkonzentration nach zweimaligem Ultrafiltrieren. Bestimmung durch Elektrophorese, Angabe in Relativ-Prozent des gesamten Serumproteingehaltes.

γ -Globulin- fraktion	Konzentration		Endkonzentration in % vom Ausgangswert
	vor Filtration	nach Filtration	
IgG	1.200 mg%	920 mg%	76%
IgA	200	144	72
IgM	134	72	54

Tab. 16 Abnahme der γ -Globulinkonzentration nach zweimaligem Ultrafiltrieren (quantitativer Proteinbestimmungstest)

Vorgang	Antibiotika- Konzentration	% vom Ausgangswert
Ausgangswert	225 $\mu\text{g/ml}$ Serum	100%
1 x filtriert	45	20%
2 x filtriert	3.15	14%
3 x filtriert	16	7%

Tab. 17: Konzentration an freiem Antibiotikum vor und nach Ultrafiltration (Hemmhofstest)

Vorgang	Bakterienkolonien		% Abtötung vom Ausgangswert
	t_0	t_2	
Ausgangswert	240	11	100%
2 x filtriert	190	41	82%
3 x filtriert	200	70	68%

Tab. 18: Abtötungsquotienten vor und nach mehrmaliger Serumfiltration

Die Tabellen zeigen Mittelwerte aus drei Filtrationsversuchen mit verschiedenen Seren.

Die Antibiotika-Konzentration nimmt bei wiederholter Ultrafiltration also nicht im berechneten Umfang ab, sondern in einem geringeren Ausmaß (evt. aufgrund einer Proteinbindung des Antibiotikum von mehr als 50%), (siehe 3.3.2.1 und Tab. 17).

Weitere störende Faktoren bei der Ultrafiltration sind die Adsorption von Proteinen an der Filtermembran, die Zunahme der Eiweißkonzentration (ein Effekt, der dem Verdünnungseffekt entgegengesetzt gerichtet ist) und der Siebeffekt durch eine Schicht von Eiweißmolekülen an der Filteroberfläche (51). Außerdem scheint durch den Stickstoffdruck von 4 bar an der Membranoberfläche eine Denaturierung von Protein stattzufinden.

4.1.2 Globulinfällung

Proteinfraktion	Konzentration		Endkonzentration in % vom Ausgangs- wert
	vor Fällung	nach Fällung	
Albumin	60 %	32.8%	55%
α_1 -Globulin	3.3%	3.3%	100%
α_2 -Globulin	9.7%	10.6%	109%
β -Globulin	14.7%	16.7%	113%
γ -Globulin	12.3%	33.3%	271%

Tab. 19 Veränderung der Serumproteinkonzentration nach Globulinfällung (Bestimmung durch Elektrophorese)

Die γ -Globulin-Fraktion ist scheinbar stark erhöht, dies ist zurückzuführen auf denaturiertes Protein, das unter den elektrophoretischen Bedingungen nicht oder nur verlangsamt wandert und sich bei der photometrischen Auswertung zur Extinktion der γ -Globuline addiert.

γ-Globulin- fraktion	Konzentration		Endkonzentration in % vom Ausgangswert
	vor Fällung mg/100 ml	nach Fällung mg/100 ml	
IgG	1.200	410	38%
IgA	200	56	28%
IgM	134	28	20%

Tab. 20: Bestimmung der γ-Globulinkonzentration nach Globulinfällung (Messung im quantitativen Proteinbestimmungstest)

Bakteri- zidietest	Bakterienkolonien				Abtötungs- quotient vor Fällung	Bakterien- zunahme nach Fällung
	vor Fällung		nach Fällung			
	t ₀	t ₂	t ₀	t ₂	%	%
1. Test	174	52	190	300	+ 70	- 173
2. Test	158	64	161	302	+ 60	- 79

Tab. 21: Abtötungsquotienten vor Fällung und Bakterienzunahme nach Fällung (zum Vergleich; ohne Serumzusatz verfünffacht sich die Ausgangszahl der Bakterienkolonien).

Die Messung der Antibiotika-Konzentration im Hemmhof-test nach Globulinfällung ergab sehr hohe Werte (außerhalb des aus der Eichkurve sich ergebenden Meßbereichs), was möglicherweise auf einen Restgehalt an Ammoniumsulfat zurückzuführen ist, der antimikrobiell wirksam werden kann.

4.1.3

Dialyse

Dialyse- dauer	IgG		IgA		IgM	
	mg/100 ml	Rel.-%	mg/100ml	Rel.-%	mg/100ml	Rel.-%
-	920	= 100	212	= 100	90.9	= 100
6 h	840	91.3	190	90	80	90
12 h	840	91.3	170	85	72	78
20 h	840	91.3	180	85	72	78
48 h	850	92	175	83	72	78

Tab. 22: γ -Globulin-Konzentrationen im Serum bei unterschiedlicher Dialysedauer

Nach 48 Stunden Dialyse ergibt sich ein Immunglobulinverlust von 8 - 22% (Tab. 22). Da die Globulinkonzentration ab dem 6-Stundenwert nur noch gering oder nicht mehr abnimmt, kann angenommen werden, daß es sich hier größtenteils um einen Pipettierverlust bei der Handhabung des Serum handelt.

Dialysedauer h	Antibiotika- konzentration	Endkonzentration in % vom Ausgangs- wert
-	355 μ g/ml	= 100
2	250	56
5	149	42
6	130	36
8	95	27
12	87	26
20	50	14

Tab. 23: Antibiotika-Konzentration im Serum bei unterschiedlichen Dialysezeiten (1. Dialyse)

Nicht-dialysiertes Serum enthielt nach einer Lagerzeit von 20 Stunden bei Kühlraumbedingungen noch 80% der Antibiotika-Ausgangskonzentration.

Dialysedauer h	Antibiotika- konzentration	Konzentration in % vom Ausgangs- wert
-	375 µg/ml	≡ 100
2	243	65
8	120	32
12	90	24
24	53	14
32	35	9
40	26	7
45	19	5

Tab. 24: Antibiotikakonzentration im Serum bei unterschiedlicher Dialysedauer (2. Dialyse)

Das dem Serum zu Tab. 24 entsprechende nicht-dialysierte Serum enthielt nach einer Lagerzeit von 45 Stunden bei Kühlraumbedingungen noch 88% Antibiotika.

Nach 48 Stunden Dialyse sind noch ca. 5% Antibiotika im Serum vorhanden (Tab. 24), die γ -Globulinkonzentration beträgt noch ca. 80 - 90% des Ausgangswertes (Tab. 22).

Die Dissoziation des Antibiotikum erfolgt nicht gemäß einer Reaktion 1. Ordnung, also einer einfachen Exponentialfunktion. Es lassen sich graphisch zwei Komponenten trennen, deren Eliminationshalbwertszeiten bei beiden Dialyseversuchen sehr gut übereinstimmen (Abb. 9 und 10).

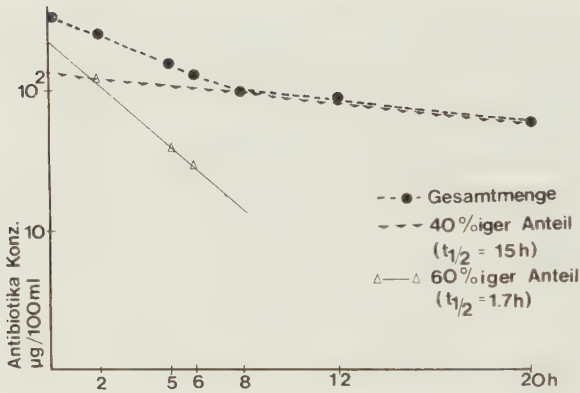


Abb. 9: Halblogarithmische Auftragung der Antibiotika-Konzentration bei unterschiedlicher Dialyседauer (1. Dialyse)
Halbwertszeiten der beiden Komponenten: 1.7 h, 15 h

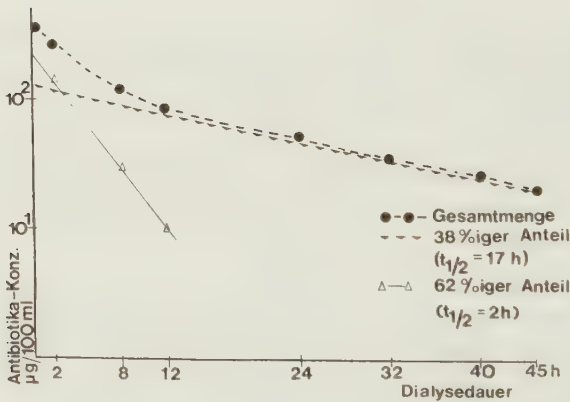


Abb. 10: Halblogarithmische Auftragung der Antibiotika-Konzentration bei unterschiedlicher Dialyседauer)
Halbwertszeiten der beiden Komponenten: 2 h, 17 h

Zu Abb. 9 und 10:

Der Anteil der Komponente mit der längeren Halbwertszeit an der gesamten Antibiotikakonzentration wird graphisch ermittelt, indem der lineare, flache Kurven-
teil bis zur Ordinate durchgezogen wird. Die Meßpunkte für die Kurve mit der kürzeren Halbwertszeit errechnen sich dann durch Subtraktion der einzelnen Punkte auf der graphisch ermittelten flachen Kurve von der experimentell ermittelten Kurve, welche beide Komponenten enthält.

Schon Goldbaum und Smith (11) haben bei Untersuchungen der Bindung von Barbituraten an Serumproteine zwei verschiedene Dissoziationskonstanten beschrieben. Andererseits ließe sich dieses Verhalten durch das relativ rasche Ausdiffundieren von freiem Antibiotikum durch die Dialysiermembran, gefolgt von einer äußerst langsamen Gleichgewichtseinstellung des gebundenen Antibiotikum erklären.

Für die Dialyseversuche wurde mit Oxacillin ein Antibiotikum mit einer sehr hohen Proteinbindung (ca. 90%) verwendet, jene bei den Patienten eingesetzten Antibiotika (Aminoglykoside, β -Lactam-Antibiotika) haben jedoch eine erheblich geringere Serumeiweißbindung (um 50%). Aus diesem Grunde kann man annehmen, daß die Eliminierung durch Diffusion bei den Versuchsseren schneller vor sich geht bzw. der verbliebene Antibiotika-Anteil nach 48 Stunden Dialyse geringer ist.

Dialyse- dauer	Poolserum		Kontroll- serum		Testserum				Abtötungs- quotient in % vom Aus- gangswert
					vor Dialyse		nach Dialyse		
h	t ₀	t ₂	t ₀	t ₂	t ₀	t ₂	t ₀	t ₂	%
0	244	22	254	22	240	11			= 100
12	"	"	"	"	"	"	243	26	94
24	"	"	"	"	"	"	223	26	93
48	"	"	"	"	"	"	259	38	89

Tab. 25: Abtötungsquotienten von antibiotikafreiem Serum in Abhängigkeit von der Dialysedauer.

Im Vergleich dazu beträgt der Abtötungsquotient eines gleichen Serum nach 48 Stunden Aufbewahrung unter Kühlraumbedingungen 95 - 100% des Ausgangswertes, nach Dialyse ist der Quotient also nur gering reduziert.

4.1.4

Anwendung der Antibiotika-Eliminierung auf den Bakterizidie-Test.

Da die Seren nach Globulinfällung nur noch eine Immunglobulinkonzentration von 20 - 38% enthielten (Tab. 20), was im Bakterizidietest zum Anwachsen der Bakterienkolonien auf 179 bis 273% des Ausgangswertes führte (Tab. 21), konnte diese Methode nicht zur Antibiotika-Eliminierung verwendet werden. Bei der Ultrafiltration wurde ein Immunglobulinverlust von 24 - 46% des Ausgangswertes (Tab. 16) und eine Abnahme des Abtötungsquotienten von 100% auf 82% (Tab. 18) nach zweimaliger Filtration gemessen. Demgegenüber weisen die dialysierten Seren einen Immunglobulinverlust von 8 - 22% nach 48 Stunden Dialysedauer und eine Verminderung des Abtötungsquotienten um 11% auf.

Da somit die Dialyse sich als die Methode mit den geringsten Serumproteinverlusten bei zugleich größtmöglicher Antibiotika-Eliminierung erwies, wurden für den Bakterizidie-Test dialysierte Seren eingesetzt. Parallel dazu wurden auch neben *Staphylokokkus aureus* die relativ antibiotika-resistenten *Serratia marcescens* (28) eingesetzt, wodurch die direkte antimikrobielle Wirkung der evt. noch nach Dialyse verbliebenen Antibiotika kontrolliert werden sollte.

Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung von Antibiotika, welche zu einem falsch-positiven Abtötungsquotienten führt, wurden jedoch auch indirekte Auswirkungen auf das Immunsystem beschrieben, welche z.B. auch bei der Verwendung von antibiotika-resistenten Bakterien besonders zum Ausdruck käme, da in diesem Fall die gesamte Antibiotika-Konzentration im Serum während des Bakterizidie-Test vorhanden ist.

Nach QUADRIPUR (46) wird die Bakterienabtötung durch Zytostatika, Antibiotika und kolloidale Lösungen gehemmt, nach ADAM et al. (2) wird sie durch Gentamycin und Polymycin in nicht-bakteriziden Dosen gefördert und nach ADAM et al. (1) wird die Monozyten-Aktivität durch Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen angeregt.

4.2 Die Abwehrsituation der verschiedenen Testpersonen-
gruppen in Abhängigkeit von Alter, Sepsis und ATT

4.2.1 Die Abhängigkeit des Bakterienwachstums und der Bak-
terienabtötung von der Zeit

Da beim Bakterizidietest pro Versuch nur drei Meßdaten vorliegen, nämlich neben der Bakterienanfangskonzentration k_0 noch k_1 nach 60 Minuten und k_2 nach 120 Minuten, kann die zugrundeliegende Kurvenfunktion nicht detailliert ermittelt werden. Weitere Messungen können wegen der kurzen in-vitro-Halblebenszeit der segmentkernigen Granulozyten (etwa 6 Stunden) nicht durchgeführt werden, außerdem ist die Abtötung der Bakterien in dem erfaßten Zeitraum von 2 Stunden weitgehend abgeschlossen.

4.2.1.1 Bakterienwachstum in Abwesenheit von bakteriziden Zu-
sätzen (Granulozyten bzw. Serum)

Bakterien vermehren sich exponentiell, wobei sich ihre Anzahl bei 37°C alle 40 min verdoppelt.

In unseren Tests ist der Ausgangspunkt meist eine Anzahl von 200 - 250 Bakterienkolonien, d.h. eine Bakterienkonz. von $4 - 5 \times 10^6/\text{ml}$ im Testansatz, welche nach zwei Stunden auf das 4 - 5-fache angestiegen ist.

4.2.1.2 Abtötungsquotienten von *Serratia marcescens* bzw. *Staphylokokkus aureus* im Ansatz mit zellulären und humoralen Immunfaktoren

Es wurden in allen Tests mit Ausnahme von Fall No. 9 zusätzlich zu *Staphylokokkus aureus* auch *Serratia marcescens* verwendet. Im Fall No. 9 war nicht mehr genügend Serum für einen Vergleich zwischen dem Abtötungsverhalten von dialysierten Serum und antibiotika-resistenten Bakterien enthaltendem Serum vorhanden. Allerdings war in diesem Fall der ATT keine antibiotische Behandlung vorausgegangen.

Bei halblogarithmischer Auftragung der Bakterizidie-
rate im Ansatz mit Kontrollgranulozyten und Serum
verschiedener Herkunft ergeben sich mit Erwachsen-
serum (Kontroll-, Pool- und Spenderserum) annähernd
Geraden (Abb. 11, 12, 13).

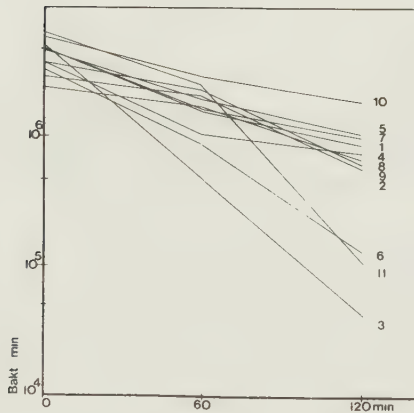


Abb. 11: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungs-
rate von *Serratia marcescens* und *Staphylo-*
koccus aureus (Patient No. 9) im Ansatz mit
Kontrollgranulozyten und Kontrollserum.

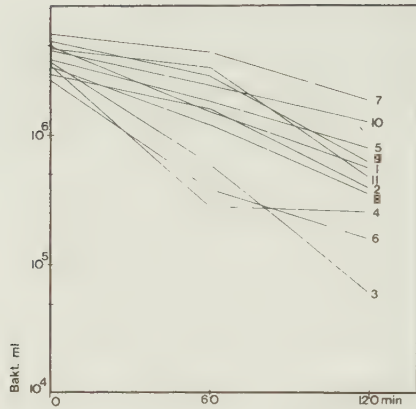


Abb. 12: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* und *Staphylococcus aureus* (Patient No. 9) im Ansatz mit Kontrollgranulozyten und Poolserum.

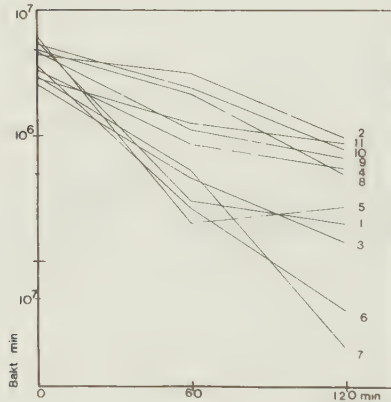


Abb. 13: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* und *Staphylococcus aureus* (Patient No. 9) im Ansatz mit Kontrollgranulozyten und Spenderserum.

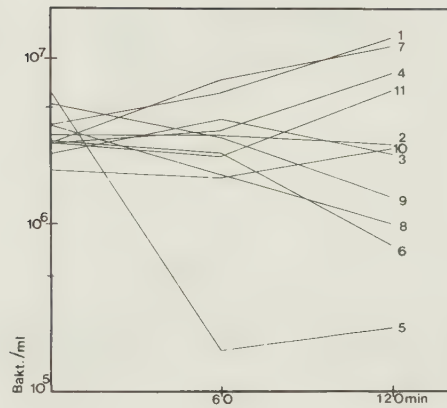


Abb. 14: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* und *Staphylokokkus aureus* (Patient No. 9) im Ansatz mit Kontrollgranulozyten und undialysiertem Patientenserum vor ATT. Bei Patient No. 5 ist *Serratia marcescens* nicht resistent gegen die im Serum vorhandenen Antibiotika.

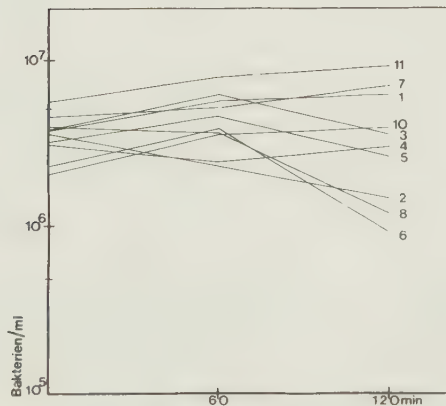


Abb. 15: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* im Ansatz mit Kontrollgranulozyten und dialysiertem Serum vor ATT. (ohne Patient No. 9)

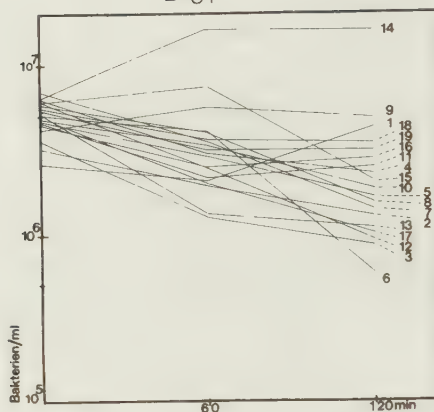
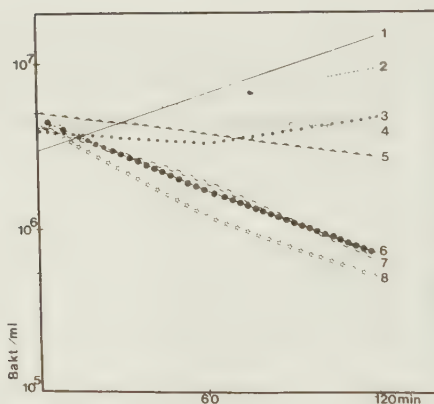


Abb. 16: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* im Ansatz mit Kontrollgranulozyten und Seren chirurgischer Kontrollpatienten.



- 1 = Bakterienwachstum ohne bakterizide Zusätze
- 2 = Ansatz ohne Serum (Tab. 27)
- 3 = undialysierte NG-Seren vor ATTI
- 4 = dialys. Seren vor ATTI
- 5 = chirurgische Patienten
- 6 = Kontrollserum
- 7 = Poolserum
- 8 = Spenderserum

Abb. 17: Vergleich der Abtötungsrate der verschiedenen Testgruppen unter Verwendung von Mittelwerten.

Patient	K	B	Poolserum			Kontrollserum		Patientenserum vor APT		Patientenserum vor APT		Spenderserum					
			t_0	t_1	t_2	t_0	t_1	t_2	t_0	t_1	t_2	t_0	t_1	t_2			
B.-. (1)	I	Se	240	73	28	244	85	39	200	305	650	230	291	320	270	15	10
G.S. (2)	II	Se	140	82	19	171	106	27	175	170	150	185	120	75	218	160	49
H.M. (3)	I	Se	187	31	3	291	24	2	145	210	131	190	328	184	131	23	7
H.T. (4)	I	Se	189	14	13	170	53	35	154	180	400	165	126	160	160	42	26
M.A. (5)	II	Se	305	91	40	207	70	49	300	4	12	187	239	137	301	10	14
O.-. (6)	I	Se	150	20	8	168	38	6	156	135	37	130	194	48	173	13	2
S.M. (7)	II	Se	284	215	92	237	107	45	160	360	600	235	260	330	145	26	1
S.A. (8)	I	Se	158	58	16	125	108	34	196	100	50	200	184	60	240	110	25
W.T. (9)	I	Sta	195	166	29	183	115	33	268	169	72	-	-	-	236	57	34
Y.W.(10)	I	Se	255	143	63	300	156	93	105	91	143	103	182	209	268	126	39
M.W.(11)	I	Se	198	126	23	338	130	5	163	128	312	284	400	480	241	65	48
Mittelwert			209	95	30	238	88	33	193	168	240	211	232	200	216	59	23
Standardabweichung			55	66	26	62	44	26	60	99	250	49	89	139	56	51	18

K = Kontrollgranulozyten, B = Bakterienart, Se = Serratia marcescens, Sta = Staphylokokkus aureus, t_0 = Zeitpunkt 0, t_1 = nach 60 min, t_2 = nach 120 min

K = Kontrollgranulozyten, B = Bakterienart, Se = Serratia marcescens,
Sta = Staphylokokkus aureus, t_0 = Zeitpunkt 0, t_1 = nach 60 min, t_2 = nach
120 min

Tab. 26: Abtötungsrate der Kontrollgranulozyten im Ansatz mit humoralen Faktoren der Patientenserum vor APT (Serumbakterizidie des Patienten) Es wurden zwei verschiedene Spender für Kontrollgranulozyten (I und II) verwendet (siehe 3.2.3)
Die Abtötungsrate wird anhand von Bakterienkolonien zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 dargestellt.

4.2.3.1 Abtötungsrate im Ansatz mit Kontrollgranulozyten ohne Zusatz von Serum

Pat.-Nr.	Kontrollgranulozyten	Bakterienkolonien		
		k_0	k_1	k_2
B.-. (1)	I	207	363	800
G.S. (2)	II	138	109	364
H.M. (3)	I	169	412	480
H.T. (4)	I	140	440	700
M.A. (5)	II	296	320	480
O.-. (6)	I	138	195	600
S.M. (7)	II	228	205	238
S.A. (8)	I	220	428	540
W.T. (9)	I	248	277	190
Y.M. (10)	I	244	272	214
M.W. (11)	I	166	250	295
Mittelwert		109	297	446
Standardabweichung		± 55	± 106	± 209

Tab. 27: Abtötungsrate der Kontrollgranulozyten im Ansatz ohne Serum (im Rahmen der in Tab. 26 aufgeführten Testansätze).

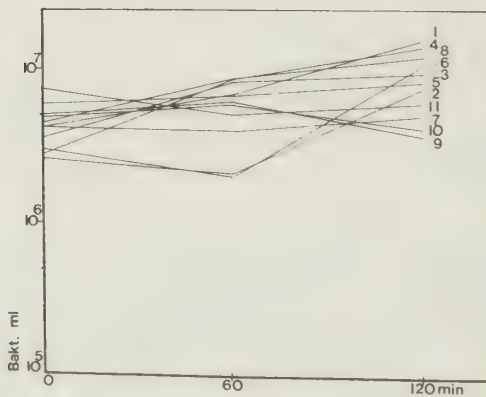


Abb. 18: Abtötungsrate von *Serratia marc.* und *Staph. aureus* im Ansatz mit Kontrollgranulozyten ohne Zusatz von Serum.

4.2.2 Die immunologische Situation bei postoperativen Sepsisfällen vor und nach ATT

4.2.2.1 Immunglobulin- und C3-Konzentrationen

Die Immunglobulin- und C3-Konzentrationen der Blutspender für die ATT bewegen sich alle im Normbereich, variieren jedoch in diesem Bereich sehr stark. Entsprechend variabel sind auch die Patientenwerte nach ATT (Tab. 27 a und b).

Patient 4 erhielt durch die ATT Frischblut (siehe 3.2.5), welches aufgrund langer Lagerdauer einen niedrigen IgG- und IgM-Gehalt aufwies. Daher wurden diese Proteinfractionen im Patientenserum nach ATT gegenüber den Konzentrationen vor ATT nicht verbessert. Bei allen übrigen ATT-Patienten konnte eine Erhöhung der Konzentrationen aller vier untersuchten Serumfraktionen erreicht werden.

Auffallend sind die hohen IgA- und IgM-Werte bei den Sepsisfällen vor ATT gegenüber den Normalwerten. Bei 7 von 8 untersuchten NG waren die IgG-Werte auffallend niedrig, in 5 Fällen waren die IgM-Werte und in 7 Fällen die IgA-Werte sehr hoch im Vergleich zur Altersnorm und zu den von uns untersuchten Kontrollkindern (siehe 4.3.2.1). Bei dem Säugling von 6 Monaten (Tab. 27 b) ist demgegenüber ein niedriger IgM-Wert vor ATT erkennbar.

Diese auffälligen Werte lassen darauf schließen, daß die passiv von der Mutter übertragenen IgG durch negativen "feed-back" eine aktive Immunisierung in Form einer IgG-Synthese verhindern können, während die IgM- und IgA-Synthese durch die Antigen-Stimulierung schon anläuft.

Patientengruppe (Alter 1 - 30 T.)	IgG mg/100ml	IgM mg/100ml	IgA mg/100ml	C3c mg/100ml	Auffallend hohe(+) bzw. niedrige (-) Werte bei Patienten vor ATT				Steigende (+) bzw. fallende (-) Werte nach ATT			
					IgG	IgM	IgA	C3c	IgG	IgM	IgA	C3c
Normwerte NG	1000(+200)	16.5(+5.4)	1.0(+1)	44.8 - 112								
B.-. (1) vor ATT nach ATT Spender	490 1080 1570	1 117 83	0 75 152	45 95 108	-	-			+	+	+	+
H.M. (2) vor ATT nach ATT Spender	800 540 850	55 81 87	57 152 183	60 53 102	-	+	+		+	+	+	+
H.T. (4) vor ATT nach ATT Spender	820 700 820	109 67 233	37 157 188	63 90 90		+	+		-	+	+	+
M.A. (5) vor ATT nach ATT Spender	850 1080 1780	45 109 214	72 138 356	99 105 138		+	+		+	+	+	+
O.-. (6) vor ATT nach ATT	750 1040	11 90	95 159	18 57	-		+		+	+	+	+
S.M. (7) vor ATT nach ATT	580 1130	1 11	16 74	57 60	-	-	+		+	+	+	+
M.T. (9) vor ATT nach ATT	630 980 810	3 134 111	16 95 62	51 108 84		-	+		+	+	+	+
Y.M. (10) vor ATT nach ATT Spender	1040 1230 1430	37 111 210	55 59 159	24 66 113					+	+	+	+
M.W. (11) vor ATT nach ATT	580 910	41 139	71 111	39 69	-		+		+	+	+	+

Tab. 27 a: Immunglobulin- und C3c-Konzentrationen bei post-operativen Sepsisfällen vor und nach ATT (Altersgruppe 1 - 30 Tage).

Patientengruppe 3 - 6 Mo.	IgG mg/100ml	IgM mg/100ml	IgA mg/100ml	C3c mg/100ml	Auffallend hohe(+) bzw. niedrige (-) Werte bei Patienten vor ATT.	Steigende (+) bzw. fallende (-) Werte nach ATT			
Normalwerte	425(+180)	48(+17)	28(+18)			IgG	IgM	IgA	C3c
S.A. (8) vor ATT nach ATT Spender	580	1	50	39	-				
	1300	68	129	69					
	1340	93	190	96					

Normalwerte zu Tab. 27 a und b: TYMPNER K.D. und JORDANIDIS K. (Diss. München 1975)

Tab. 27 b: Immunglobulin- und C3c-Konzentration bei einem 6 Monate alten postoperativen Sepsispatienten vor und nach ATT und beim Spender.

Erwachsenen-Konzentration	IgG mg/100 ml	IgM mg/100 ml	IgA mg/100 ml	C3c mg/100 ml
Normalwerte	800-1800	60-250	90-450	80-140

Tab. 27 c: Erwachsenennormalwerte für Immunglobuline und C3c
aus: "Reagenzien zur qualitativen und quantitativen Plasmaproteinbestimmung", Behringwerke AG.

Die C3c-Konzentrationen bei den postoperativen Sepsispatienten vor ATT betragen im Mittel 50.7 mg/100 ml (+ 23 mg/100 ml), dies liegt innerhalb des Normbereichs für NG (siehe S.12), der bei 56% der Erwachsenenkonzentration liegt.(= 44.8 - 78.4 mg/100 ml).

4.2.2.2 Serumbakterizidie (Bestimmung im indirekten Bakterizidietest)

4.2.2.2.1 Vergleich der Abtötungsquotienten vor und nach der 1.ATT

Die Änderung der Bakterienkonzentration innerhalb von zwei Stunden nach Messung der Anfangskonzentration ist eine Superposition mehrerer, gleichzeitig ablaufender Prozesse, nämlich des exponentiellen Anwachsens der Bakterienzahl, der Abtötung dieser Bakterien durch humorale und zelluläre Faktoren, der physiologisch kurzen Halblebenszeit der Phagozyten und darüberhinaus einer weiteren Verkürzung ihrer Lebensdauer durch die phagozytotische Aktivität an sich. Ein Granulozyt ist allerdings zur Abtötung mehrerer Bakterien fähig.

Nach Abb. 11 bis 13 verläuft zwar bei Erwachsenen die Abtötungsrate annähernd exponentiell, andererseits zeigt

sie aber bei den Patienten und chirurgischen Kontrollen (Säuglingen) einen sehr uneinheitlichen Verlauf, der einen Vergleich der verschiedenen Ergebnisse durch Rückführung der Kurvenverläufe auf Unterschiede in den Konstanten der Exponentialfunktion unmöglich macht. Daher wurde im folgenden zur Interpretation die "Abtötungsrate" ersetzt durch den "Abtötungsquotienten", der ermittelt wird aus der Anfangs- und Endkonzentration der Bakterienkolonien (bzw. Bakterienanzahl) nach

$$Q = \frac{k_0 - k_2}{k_0} \cdot 100$$

in Prozent des Ausgangswertes.

Pat.-Nr.	Bakterienkolonien im indirekten Bakterizidietest					
	vor ATT			nach ATT		
	k ₀	k ₁	k ₂	k ₀	k ₁	k ₂
B.-. (1)	200	305	650	246	64	20
G.S. (2)	175	170	150	120	109	21
H.M. (3)	145	210	131	147	95	28
H.T. (4)	154	180	400	143	47	64
M.A. (5)	300	4	12	301	37	2
O.-. (6)	156	135	37	168	8	1
S.M. (7)	160	360	600	156	240	8
S.A. (8)	196	100	50	200	148	14
W.T. (9)	268	169	72	186	25	20
Y.M. (10)	105	91	143	132	7	5
M.W. (11)	263	128	312	240	74	29
Mittelwert	193	168	240	194	77	19
Standard- $\pm$ abweichung	60	99	230	64	69	17

Tab. 28: Abtötungsraten der Kontrollgranulozyten im Ansatz mit undialysierten Patientenserum vor und nach ATT (die Bezugswerte für Pool-, Kontroll-, Spenderseren, die Bakterienart und der Granulozytenspender sind in Tab. 26 aufgeführt).

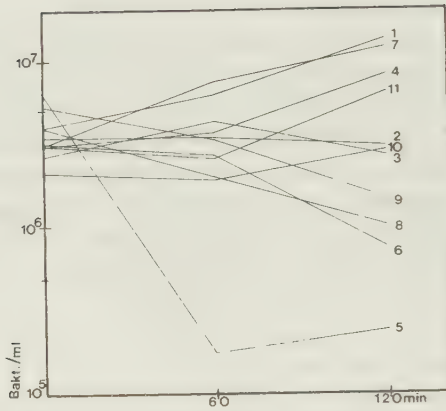


Abb. 19: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* im Ansatz mit undialysierten Patientenserum vor ATT.(Tab.28)

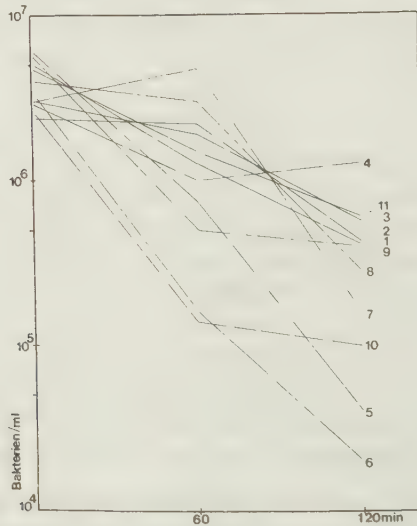


Abb. 20: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* im Ansatz mit undialysierten Patientenserum nach ATT (Tab. 28).

Pat.-Nr.	Poolserum	Kontrollserum	Patientenserum		Spenderserum
			Vor ATT	nach ATT	
	%	%	%	%	%
B.-. (1)	88.4	84.1	- 220	91.9	96.3
G.S. (2)	86.4	84.3	14.3	82.5	77.6
H.M. (3)	98.4	99.4	9.7	81	95
H.T. (4)	93.1	85.3	- 159.7	55.2	84.1
M.A. (5)	86.9	84	93 ★	99.3	95.3
O.-. (6)	94.7	96.5	76.3	99.4	98.8
S.M. (7)	67.7	81.1	- 275	94.9	99.3
S.A. (8)	89.9	84.2	83.1	93	89.6
W.T. (9)	85.2	82	73.1	92.9	85.5
Y.M. (10)	75.7	69	- 36.2	96.2	99
M.W. (11)	88.3	98.5	- 56.6	87.8	86.1
Mittelwert	86.7	86.2	- 43.4	88.6	92
Standard- abweichung	± 8.2	± 8.9	± 129.9	± 12.6	± 7.3

Tab. 29: Abtötungsquotient $\left(\frac{k_0 - k_2}{k_0} \cdot 100 \right)$

der nicht-dialysierten Patientenseren. Die mit " - " bezeichneten Prozentangaben bezeichnen einen Bakterienzuwachs in Prozent vom Ausgangswert. Bei allen Seren mit Ausnahme von Patient No. 9 wurde *Serratia marcescens* verwendet. In ★ Fall No. 5 erwiesen sich *Serratia* vor ATT als nicht resistent gegen die im Serum vorhandenen Antibiotika.

Pat.-Nr.	Bakterienkolonien								
	Patientenseren						Spenderseren		
	vor ATT			nach ATT					
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₀	t ₁	t ₂	t ₀	t ₁	t ₂
B.-. (1)	230	291	320	274	117	50	230	31	33
G.S. (2)	185	120	75	147	100	42	141	11	4
H.M. (3)	199	328	134	215	130	61	146	180	12
H.T. (4)	165	126	160	153	97	53	15-	74	52
M.A. (5)	287	239	137	100	51	17	301	3	14
O.-. (6)	130	104	48	146	32	8	146	18	16
S.M. (7)	235	200	330	281	240	52	214	100	48
S.A. (8)	203	183	200	230	60	100	200	33	2
Y.M. (10)	200	184	60	160	148	16	240	10	25
M.W. (11)	284	400	480	205	84	24	241	65	48
Mittelwert	211	232	200	213	110	44	202	53	25
Standard- abweichung	49	89	139	60	60	30	53	55	10

Tab. 30: Abtötungsraten der Kontrollgranulozyten im Ansatz mit dialysierten Patientenseren vor und nach ATT (Werte für Pool-, Kontrollseren siehe Tab. 26).

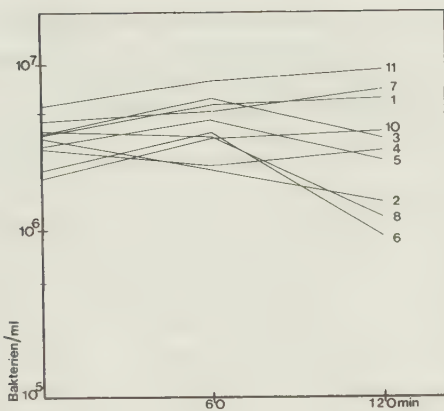


Abb. 21: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungs-
rate von *Serratia marcescens* im Ansatz mit
dialysierten Patientenserum vor ATT (Tab. 30, 31)

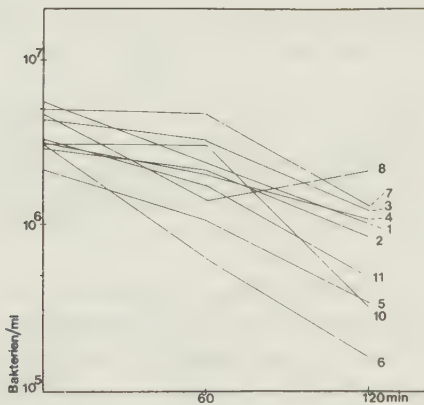


Abb. 21 a: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungs-
rate von *Serratia marcescens* im Ansatz mit
dialysierten Patientenserum nach ATT (Tab. 30, 31)

Pat.-Nr.	Patientenseren		Spenderseren
	vor ATT	nach ATT	
	%	%	%
E.-. (1)	- 39.1	81.8	85.7
G.S. (2)	50.4	71.5	97.2
H.A. (3)	7.5	71.6	91.8
H.F. (4)	5.1	66.5	68.3
H.A. (5)	52.2	94.5	95.3
G.-. (6)	55.1	94.5	89.1
S.A. (7)	- 40.4	87.9	87.6
S.A. (8)	0	90	89.6
Y.M. (10)	- 3	54.1	30
M.W. (11)	- 69	88.2	79.3
Mittelwert	- 3.6	80	88.3
Standard- abweichung	± 50.6	± 13.5	± 9.1

Tab. 31: Abtötungsquotient ($\frac{k_0 - k_2}{k_0} \cdot 100$) der dialy-

sierten Patienten- und Spenderseren. Kontroll- und Poolseren siehe Tab. 30. Die mit "-" bezeichneten Werte bedeuten eine Bakterienanstieg in Prozent vom Ausgangswert. Serum No. 9 war nicht dialysiert, da keine Antibiotikabehandlung vorausgegangen war.

Da in allen Fällen der Abtötungsquotient nach ATT im Vergleich zur Situation vor ATT verbessert ist, ist der Unterschied zwischen "vor ATT" und "nach ATT" (Tab. 31) statistisch hochsignifikant ($p \leq 0.001$). Dasselbe trifft trifft auch für die undialysierten Seren zu (Tab. 30).

Pat.-Nr.	Abtötungsquotienten			Rangzahl	
	undialysierte Patientenserum	dialysierte Patientenserum	Differenz		
	%	%	%	+	-
B.-. (1)	- 220	- 39.1	+ 180.9	9	
G.-. (2)	14.3	59.4	+ 45.1	7	
H.M. (3)	9.7	7.6	- 2.1		1
H.T. (4)	- 159.7	3.1	+ 156.5	8	
M.A. (5)	93	52.2	- 40.8		6
O.-. (6)	76.3	63.1	- 13.2		4
S.M. (7)	- 275	- 40.4	+ 234.6	10	
S.A. (8)	83.1	70	- 13.1		3
Y.M. (10)	- 36.3	- 3	+ 33.2	5	
M.W. (11)	- 56.6	- 69	- 12.3		2

Tab. 32: Wilcoxon-Test (siehe S. 48)
Vergleich der Abtötungsquotienten von nicht-dialysierten und dialysierten Patientenserum vor ATT (N = 10).

Die Rangsumme der negativen Rangzahlen ist 16, der kritische Wert für $\alpha \leq 0.05$ ist 8. Der Vergleich zeigt keine statistische Auffälligkeit.

In Tab. 32 wird jedoch deutlich, daß in 5 von 10 Fällen die dialysierten Seren eine z.T. sehr viel höheren Abtötungsquotienten aufweisen. Dies kommt auch beim Vergleich der Mittelwerte der Abtötungsquotienten von undialysierten und dialysierten Seren zum Ausdruck (Tab. 30 und 31).

4.2.2.2.2 Vergleich der Abtötungsquotienten vor und nach der 2. ATT

Bei einem Teil der Patienten mußte eine zweite ATT vorgenommen werden, da sich im klinischen Krankheitsbild wenige Stunden nach der 1. ATT wieder eine Verschlechterung einstellte.

In Tab. 33 fällt bei Patient No. 4 auf, daß keinerlei Verbesserung der bakteriziden Fähigkeit durch den wiederholten Austausch eintritt. Dies ist offensichtlich auf das Alter des Spenderblutes zurückzuführen. Es wurde vermutet, daß eine lange Lagerzeit des Blutes vor ATT zur verminderten Bakterizidie führte (siehe 4.3 und 4.2.2.3).

Bei den Patientenseren vor ATT (Tab. 34) fällt auf, daß vor der 2. ATT eine bessere Bakterizidie nachgewiesen wird als vor der 1. ATT. Eine Ausnahme zeigt Patient No. 4, bei welchem schon während der Verlaufskontrollen zwischen 1. und 2. ATT eine konstante Verschlechterung der Immunantwort auffiel.

Da nicht alle Patienten eine 2. ATT erhielten und somit die Anzahl der Testseren ($n = 6$) niedrig ist, können aus diesen Ergebnissen kaum allgemeingültige Rückschlüsse auf die Immunsituation der Patienten vor der 2. ATT gezogen werden. Es stellt sich die Frage, ob der Effekt einer weiteren ATT nicht primär in der weiteren Keimausschwemmung im Fall eines bakteriellen Streuherdes zu suchen ist und weniger in der Substitution von Immunfaktoren.

Pat.-Nr.	Kontroll- granulozyten	Pool- serum	Kontroll- serum	Patientenserum vor ATIT	Patientenserum nach ATIT	Spender- serum
		k ₀	k ₂	k ₀	k ₂	k ₀
						k ₂
Undialy- sierte Serien						
G.S. (2)	II	223	52	250	74	220
H.M. (3)	I	187	3	291	1	147
H.T. (4)	I	189	13	170	1	170
O.- (6)	I	187	3	291	1	156
S.M. (7)	II	158	16	215	34	205
S.A. (8)	I	184	92	239	45	178
Mittelwert		205	30	242	26	179
Standardabweichung $\pm$		44	35	46	30	28
Dialysierte Serien						
G.S. (2)	II					217
H.M. (3)	I					200
H.T. (4)	I					143
O.- (6)	I					146
S.M. (7)	II					220
S.A. (8)	I					178
Mittelwert						184
Standardabweichung $\pm$						34

Tab. 33: Abtötungsraten vor und nach der 2. ATIT
bei 6 Patienten
k₀ = Bakterienkolonien bei Stunde 0
k₂ = Bakterienkolonien nach 120 min

Pat.-Nr.	Poolserum	Kontrollserum	Patientenserum		Spenderserum	
	%	%	vor ATT	nach ATT		
Undialysierte Serum			%	%	%	
	G.S. (2)	76.7	70.4	61.8	82.4	98.4
	H.M. (3)	98.4	99.7	81	94	96
	H.T. (4)	93.1	79.4	- 229.4	- 119	75
	O.- (6)	98.4	99.7	92.3	91.8	92.9
	S.M. (7)	67.7	91.1	56.1	87.6	93.6
	S.A. (8)	89.9	84.2	59.6	81.6	81.6
	Mittelwert	87.5	87.4	1.7	40.5	67
	Standardab- weichung	± 12.5	± 11.6	± 124	± 117,4	± 69.5
	Dialysierte Serum					
G.S. (2)				50.2	71.1	
H.M. (3)				40	40.8	
H.T. (4)				- 218	- 140	
O.- (6)				91.8	96.9	
S.M. (7)				5.5	60	
S.A. (8)				75	68	
Mittelwert				7.2	37.5	
Standard- abweichung				± 114	± 89.4	

Tab. 34: Vergleich der Abtötungsquotienten $\left(\frac{k_0 - k_2}{k_0} \cdot 100 \right)$

von undialysierten und dialysierten Patientenserum vor und nach der 2. ATT

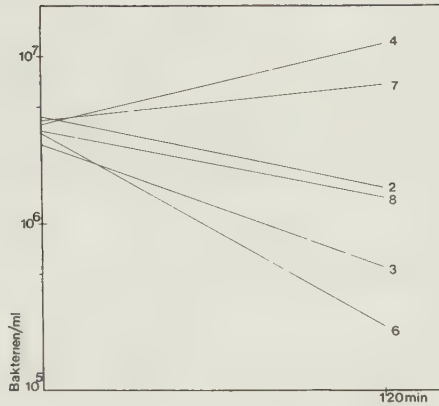


Abb. 22: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* im Testansatz mit Kontrollgranulozyten und undialysierten Patientenserum vor der 2. ATT.

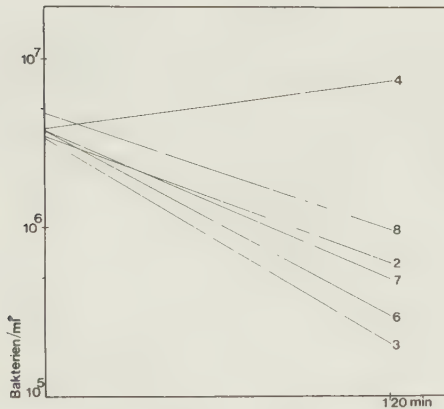


Abb. 23: Halblogarithmische Auftragung der Abtötungsrate von *Serratia marcescens* im Testansatz mit Kontrollgranulozyten und undialysiertem Serum nach der 2. ATT.

Pat.-Nr.	Abtötungsquotienten			
	Undialysierte Patienten-Seren		Dialysierte Patienten-Seren	
	nach 1. ATT	vor 2. ATT	nach 1. ATT	vor 2. ATT
	±	±	±	±
G.S. (2)	82.5	61.8	71.5	50.2
H.W. (3)	81	81	71.6	40
O.-. (6)	99.4	92.3	94.5	91.8
S.M. (7)	94.9	56.1	87.9	5.5
S.A. (8)	93	59.6	90	75
Mittelwert	90.1	47.8	85.1	52.5
Standard- abweichung	± 8.3	± 60	± 10	± 33

Tab. 35: Bestimmung der Veränderung des Abtötungsquotienten

$$\left(\frac{k_0 - k_2}{k_0} \cdot 100 \right)$$
 zwischen der 1. und 2. ATT.

Bei der Gegenüberstellung der Abtötungsquotienten der Patientenseren nach 1. ATT und vor 2. ATT wird deutlich, daß die erniedrigte Bakterizidie und damit eine verschlechterte Immunlage nicht die alleinige Indikation für eine 2. ATT gewesen sein dürfte.

4.2.2.2.3 Verlaufskontrollen bei überlebenden Patienten nach ATT

Mit Ausnahme eines Patienten (Patient No. 4) wiesen alle 7 überlebenden weiteruntersuchten ATT-Patienten innerhalb des ersten und zweiten Monats nach der ATT bessere Ergebnisse im Bakterizidie-Test auf als vor ATT. Drei Patienten konnten noch weitere 3 und zwei Patienten noch 4 Monate lang nach ATT kontrolliert werden und zeigten im Vergleich zu den chirurgischen Kontrollen (Säuglinge derselben Altersgruppe, siehe 4.2.3) bessere Ergebnisse.

Patient No. 4 war von den nach ATT weiterkontrollierten Patienten der einzige, der bei der 1. ATT Frischblut (siehe S.2) erhalten hatte, alle anderen waren mit Warmblut versorgt worden. Dies könnte in diesem Fall die schlechte Abwehrlage innerhalb der auf die ATT folgenden zwei Monate vielleicht teilweise erklären.

Auffällig ist, daß unter 6 Fällen (von insgesamt 11) mit letalem Ausgang 3 Patienten Frisch- bzw. Konservenblut erhalten hatten, während alle 5 überlebenden Patienten mit Warmblut ausgetauscht worden waren.

Pat.-Nr.	ATT Nr.	Zeit zwischen Op und ATT	Alter des Spenderblutes	Abtötungsquotienten								Weiterer Verlauf	
				Patientenseren vorATT		Spender-serum	Verlaufskontrollen nach ATT						
				%	%		%	1. Mo.	2. Mo.	3. Mo.	4. Mo.		
G.S. (2)	1. 2.	50 h 100 h	Warmblut Konserve	59.4 50.2	71.5 71.1	97.2 98.4					65.7	entlassen	
H.T. (4)	1.	30 T.	Frischbl.	3.1	66.5	68.3							gestorben
M.A. (5)	1.	30 T.	Warmblut	52.2	94.5	95.3						86	entlassen
S.M. (7)	1. 2.	30 T. 31 T.	Warmblut Warmblut	-40.4 5.5	87.9 60	87.6 93.6							entlassen
S.A. (8)	1.	6 T.	Warmblut Warmblut	70 75	90 68	89.6 81.6							entlassen
W.T. (9)	1.	9 T.	keine Angabe	73.1	92.9	85.5						86.8	entlassen
Y.M. (10)	1.	3 T.	Warmblut	- 3	54.1	99							gestorben (2.Monat)

Tab. 37: Vergleich der Abtötungsquotienten bei Verlaufskontrollen an Patienten 1 - 4 Monate nach ATT mit der Situation vor ATT.

4.2.2.3 Die Granulozytenfunktion ausgedrückt durch den Abtötungsquotienten im direkten Test.

Da nur 2 der 11 Patienten direkt nach ATT mit eigenen Granulozyten und Serum im direkten Test überprüft werden konnten, können aus diesen zwei untersuchten Fällen keine endgültigen Schlüsse gezogen werden.

Da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung weder eine Antibiotikaeliminierung möglich war, noch antibiotika-resistente *Serratia marcescens* verwendet wurden, kann das Patientenserum nicht ausgewertet werden. Aus diesem Grunde wurde nur die Granulozytenfunktion des Patientenblutes in Kombination mit dem Kontrollserum geprüft.

Bei Patient No. 2 konnte keine Verbesserung der Bakterizidie durch die ATT festgestellt werden, bei Patient No. 4 wurde durch das Spenderblut die Bakterienabtötung noch verschlechtert (siehe auch S. 82).

Die Bakterizidie-Wirkung des Patientenblutes vor ATT war durchschnittlich um ca. 20% niedriger als die des Erwachsenenblutes.

Pat.-Nr.	Kontroll- granulozyten	Patienten- granulozyten		Spender- granulozyten
	in Kombination mit			
	Kontrollserum	Kontrollserum		Spenderserum
	%	vor ATT	nachATT	%
		%	%	
G.S. (2)	78	57	60	85
H.T. (4)	86	69	-454	-236

Tab. 37: Vergleich der Abtötungsquotienten von Patienten-granulozyten und Kontrollserum vor und nach ATT mit Kontrollpersonen und Spendern (als Bakterium wurde *Staphylokokkus aureus* eingesetzt).

4.2.3 Vergleich der immunologischen Situation bei chirurgischen Kontrollen vor und nach Operation

4.2.3.1 Immunglobulinkonzentration

Bezeichnend für die chirurgischen Kontrollpatienten ist vor allem die postoperative Normabweichung. Es wurde in allen Fällen ein Konzentrationsabfall an IgG registriert und in 3 von 6 Fällen fiel bei den IgA- und IgM-Fraktionen innerhalb von 1 - 3 Tagen nach der Operation ein Anstieg auf (Tab. 38).

4.2.3.2 Abtötungsraten

Es zeigt sich in Tab. 39 und 40, daß der chirurgische Kontrollpatient No. 14 den Ergebnistrend deutlich verfälscht aufgrund des hohen Bakterienzuwachses.

Wenn man diesen Patienten im Wilcoxon-Test in Tab. 40 nicht berücksichtigt, ergibt sich eine statistische Auffälligkeit ($\alpha \leq 0.05$). Dies würde bedeuten, daß nach der Operation (1 - 3 Tage postoperativ) die Immunantwort verbessert wäre.

Patientengruppe	IgG mg/100 ml	IgM mg/100 ml	IgA mg/100ml	steigende (+) bzw. fallende (-) Konzentration nach der Operation		
Normalwerte für NG	100(+200)	16,5(+5,4)	1,0(+1)	IgG	IgM	IgA
Z.-. (10) vor Op nach Op	1300 1000	1 16	- 2	-	+	+
Normalwerte für Sgl. mit 1 - 3 Monaten	430(+120)	44(+20)	17(+10)			
A.S. (1) vor Op nach Op	420 440	42 42	5 5	-		
L.C. (7) vor Op nach Op	450 400	54 56	3 2	-	+	-
K.-. (12) vor Op nach Op	600 340	51 31	5 5	-	-	+
Normalwerte für Sgl. mit 4 - 6 Monate	425(+130)	48(+17)	23(+13)			
W.P. (17) vor Op nach Op	400 390	91 96	5 5	-	+	
Normalwerte für Sgl. mit 7 - 12 Monaten	660(+220)	60(+21)	40(+13)			
K.-. (8) vor Op nach Op	620 510	105 84	5 5	-	-	+

Tab. 38: Immunglobulinkonzentrationen bei Kontrollpatienten innerhalb von 1 - 3 Tagen vor und nach Operation (Op = Operation, Sgl. = Säugling).

Kontroll- Pat.-Nr.	Poolserum			Kontrollserum			Serum der Kontrollpatienten					
	Bakterien- kolonien			Q	Bakterien- kolonien			Q	Bakterien- kolonien			Q
	k ₀	k ₁	k ₂	%	k ₀	k ₁	k ₂	%	k ₀	k ₁	k ₂	%
A.S. (1)	198	156	27	88	238	230	24	93	130	109	212	7
B.V. (2)				88				93	150	90	54	60
B.A. (3)				38				93	160	62	42	77
G.K. (4)	200	123	52	74	513	105	38	88	513	150	113	64
H.F. (5)				74				88	231	143	36	63
H.U. (6)				74				88	250	194	29	28
K.C. (7)	290	155	61	78	260	79	37	87	353	175	64	82
K.M. (8)	235	208	117	50	217	44	21	93	276	197	65	78
M.-. (9)				88				93	210	273	238	-
M.A. (10)				74				88	239	170	88	53
M.C. (11)				74				88	230	112	118	48
R.F. (12)				78				87	300	129	50	83
R.G. (13)				78				87	260	63	60	77
S.A. (14)				72				87	322	786	720	-
T.W. (15)				78				87	295	360	93	68
W.T. (16)				74				88	219	125	128	42
Z.A. (17)				78				87	262	94	57	77
Z.-. (18)				88				93	277	182	157	43
Z.C. (19)				88				93	267	161	132	51
Mittelwert									251	185	128	50
Standardabweichung +									56	150	152	42

Tab. 39: Vergleich der Abtötungsraten der chirurgischen Kontrollpatienten vor und nach Operation mit Pool- und Kontrollserum. Es handelt sich um vier verschiedene Spender von Kontrollgranulozyten, von denen auch jeweils das Kontrollserum stammte.
Die mit "-" bezeichneten Werte bedeuten einen Bakterienzuwachs in Prozent vom Ausgangswert.
Q = Abtötungsquotient

Kontroll- Pat.-Nr.	Abtötungsquotient			Rangzahlen	
	präoperativ	postoperativ	Diffe- renz.	+	-
	‰	‰	‰		
(1)	7	81	74	14	
(2)	50	79	19	9	
(3)	77	42	- 35		11
(4)	64	72	8	3.33	
(5)	53	52	- 1		1
(6)	88	75	- 13		7
(7)	32	73	- 9		4
(8)	78	88	10	4.5	
(9)	- 13	34	47	13	
(10)	63	46	- 17		7.5
(11)	48	38	- 10		4.5
(12)	83	80	- 3		2
(13)	77	90	13	6	
(14)	- 123	- 528	405		15
(15)	68	76	8	3.33	
(16)	42	59	17	7.5	
(17)	77	85	8	3.33	
(18)	43	73	30	10	
(19)	51	66	36	12	

Tab. 40: Wilcoxon-Test

Vergleich der Abtötungsquotienten vor und nach Operation bei chirurgischen Kontrollpatienten.

Bei Herausnahme von Patient No. 14 ergibt sich eine Rangzahlensumme von 37, der kritische Wert für $n = 18$ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ≤ 0.05 ist 40. Das Ergebnis ist statistisch auffällig.

4.3 Abnahme der Bakterizidie von Granulozyten und Serum in Abhängigkeit von der Lagerdauer

4.3.1 Immunglobulin- und C3c-Konzentrationen

Lagerdauer (in Std.)	IgG mg/100 ml	IgM mg/100 ml	IgA mg/100 ml	C3c mg/100 ml
<u>20°C</u>				
0	970	118	132	81
24	940	118	142	90
64	750	110	100	10
<u>4°C</u>				
0	970	118	132	81
24	1000	118	132	90
64	1000	118	132	90

Tab. 41: Konzentration an Immunglobulinen und C3c in Spenderserum in Abhängigkeit von der Lagerdauer. (zum Zeitpunkt 0, nach 24 und 64 Std. bei Raumtemperatur und bei 4°C).

Bei 4°C (Kühlraum) ist kein auffälliger Konzentrationsabfall zu verzeichnen, bei einer Lagerdauer von 64 Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) sind alle vier Fraktionen erniedrigt.

4.3.2 Abtötungsraten

4.3.2.1 Abnahme der bakteriziden Aktivität von Granulozyten bei Lagerung von Vollblut.

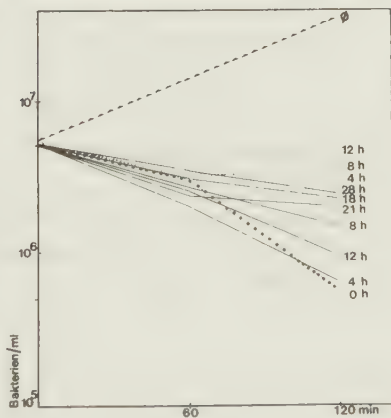
Bei der ATT mit "Warmblut" (Definition siehe S. vergehen von der Blutabnahme bis zur ATT oft mehrere Stunden, zusätzlich muß man mit einer Austauschdauer von etwa 1 - 2 Std. rechnen. Frisch- und Konservenblut (siehe Definitionen S.2) werden bei 4° im Kühlschrank aufbewahrt.

Lager- dauer h	Granulozyten I						Granulozyten II					
	mit ACD			ohne ACD			mit ACD			ohne ACD		
	Q	Z	P	Q	Z	P	Q	Z	P	Q	Z	P
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0	= 100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	40	60	24	100	100	100	50	70	35
8	75	70	53	36	20	16	75	75	56	50	40	20
12	90	81	72	24	40	10	81	44	36	38	76	20
18	50	25	13				72	30	22			
21	59	24	14				60	30	18			
26	54	12	8				62	10	26			

Tab. 42: Abtötungsquotienten in Abhängigkeit von Lagerdauer und ACD-Zusatz bei zwei verschiedenen Versuchspersonen (I und II)
 Q = Phagozytosequotient,
 Z = Granulozytenzahl,
 P = gesamte Phagozytosefähigkeit ($Q \cdot Z/100$)

Abb. 24: Verlust des Bakterizidieffektes von Granulozyten bei einer Lagerzeit von 4, 8, 12, 18, 21 und 26 Std. bei Raumtemperatur (ca. 20°C)

..... ohne ACD
 — mit ACD
 ▲▲▲▲ Ø Bakterienwachstum ohne bakterizide Zusätze



Durch die Untersuchungen von Blut ohne ACD-Zusatz sollten zusätzliche Aktivitätseinbußen durch Lagerung nach der ATT und infolge der Testbedingungen ermittelt werden.

Während der Lagerzeit nimmt einerseits die Konzentration der lebensfähigen Granulozyten im Blut ab (siehe Tab. 42), andererseits wird unabhängig davon im Bakterizidietest durch die konstante Einstellung der Granulozytenanzahl auf gleiche Werte pro Testansatz die Verminderung der phagozytotischen Tätigkeit erfaßt (in Tab. 42 ausgedrückt in Q). Die Gesamteinbuße an zellulärer Abwehr durch die Lagerzeit ergibt sich also aus dem Produkt der anteilmäßigen Granulozytenzahl (ausgedrückt in Prozent vom Ausgangswert) und dem verbleibenden Abtötungsquotienten.

Die Färbbarkeit der Granulozyten mit Trypan Blau als Maß einer irreversiblen Zellschädigung bleibt bei der Lagerung zu allen Zeitpunkten unter 10% der Granulozytenzahl. Dies läßt darauf schließen, daß die geschädigten Granulozyten sehr schnell aus dem Stadium der Trypan-Blau-Färbbarkeit (Membranschädigung) in das Stadium der Lyse übergehen und nicht mehr nachweisbar sind.

- 4.3.2.2 Aktivitätseinbuße der humoralen Faktoren durch Lagerung
- Das Serum wurde unter "Blutbankbedingungen" im Kühlschrank bei 4°C und außerdem bei Raumtemperatur (20°C) bis zu 64 Stunden aufbewahrt und die Abtötungsquotienten der verschiedenen Lagerzeiten wurden miteinander verglichen.

Lager- zeit	Abtötungsquotient 4°C		Abtötungsquotient 20°C	
	%	Rel.-%	%	Rel.-%
0			80	≡ 100
6			78	98
16	88	≡ 100	73	91
24	72	90	65	83
48	69	83	43	54
56	84	95	42	53
64	31	92	33	41

Tab. 43: Abtötungsquotienten bei unterschiedlicher Lagerdauer von Serum bei 4°C und bei Zimmertemperatur.

Das bei 4°C aufbewahrte Serum erleidet bis zu 64 Stunden nur einen geringen Bakterizidie-Verlust, während das bei Raumtemperatur gelagerte Serum kontinuierlich an bakterizider Aktivität verliert. Dieser rasche Abfall entspricht möglicherweise dem in Tab. 43 erfaßten 63% -Verlust während derselben Lagerzeit.

5

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

5.1

Antibiotika-Eliminierung

Zur Ausschaltung des Antibiotikaeffektes im Patientenserum standen 3 Methoden zur Diskussion:

Methode	Wert nach Antibiotikaelimination in % des Ausgangsbetrages		
	γ -Globulin- Fraktion	Abtötungs- quotient	Antibiotika- konzentration
1. Globulinfällung	20 - 38	keine Abtö- tung meßbar	hoch (außerhalb des Meßbereichs)
2. Ultrafiltration (2 x)	54 - 76	- 41	14
3. Dialyse (45 Std.)	78 - 92	- 11	5

Tab. 44 Gegenüberstellung der Auswirkungen der verschiedenen Methoden zur Antibiotika-Eliminierung auf die γ -Globulinfraktionen, den Abtötungsquotienten und die Antibiotika-Konzentration (Tab. 15 - 24).

Nach Tab. 44 wird durch die Dialyse im Vergleich zu den anderen Methoden der Antibiotika-Eliminierung der geringste γ -Globulinverlust bei größtmöglicher Antibiotikaeliminierung erreicht. Zur Vereinheitlichung wurden sämtliche Patienten- und Spenderseren vor Einsatz im Bakterizidietest dialysiert. Zum Ausschluß eines eventuell noch vorhandenen direkten Antibiotikaeffektes auf die Bakterien wurden im Bakterizidietest *Serratia marcescens* eingesetzt (28), die sich im allgemeinen resistent gegenüber Penicillin, Cephalotin, Polymyxin und einigen Aminoglycosiden (50) erwiesen. Patient 2 wurde vor ATT mit Penicillin, Patient 5 mit der Kombination Cephalotin, Tobramicin und Amikacin und die übrigen Patienten (außer Patient 1 und 9) mit Cephalotin und Tobramicin behandelt. Der ausschließ-

liche Einsatz von antibiotikaresistenten Bakterien ohne vorherige Eliminierung des Antibiotikum aus dem Serum schien nicht sinnvoll, da einerseits die Antibiotikaresistenz in einem Fall (Patient 5) fraglich war und andererseits eine indirekte Wirkung von Antibiotika auf Phagozyten und Monozyten beschrieben wird (S. 57, 6.2.1)

5.2 Die Abwehrsituation im Vergleich von Erwachsenenserum mit dem Serum von Säuglingen und NG (Sepsisfällen) anhand der Abtötungsrate und Abtötungsquotienten.

Patienten	Mittelwerte der Abtötungsquotienten nach 120 min ($\pm$ Standardabweichung)
1. Erwachsene: Poolserum	86.7 ($\pm$ 8.2)
Kontrollserum	86.2 ($\pm$ 8.9)
Spenderserum	92 ($\pm$ 7.3)
2. Säuglinge	50 ($\pm$ 42.0)
3. NG (Sepsisfälle)	keine Verminderung der Anfangskonzentration, sondern <u>Anwachsen</u> der Bakterienkolonien auf
dialysierte Seren	103.6 ($\pm$ 50.6) %
undialysierte Seren	143.4 ($\pm$ 129.9) %

Tab. 45: Vergleich der mittleren Abtötungsquotienten und Standardabweichungen von Erwachsenenserum mit Seren von Säuglingen und NG (Sepsisfälle) siehe Tab. 30 und 31

Bei halblogarithmischer Auftragung der Bakterizidierate ergeben sich bei Erwachsenenserum (Kontroll-, Pool- und Spenderserum, Abb. 11, 12 und 13) annähernd Geraden, während bei Säuglingen und NG kein einheitlicher Kurvenverlauf mehr zu erkennen ist (Abb. 14, 15, 16 und 17). Dieses uneinheitliche Verhalten drückt sich auch in der höheren Standardabweichung der Abtötungsquotienten aus (Tab. 30, 31 und 45).

5.3 Behandlungserfolg durch die ATT

5.3.1 Vergleich der Abtötungsquotienten

Im Wilcoxon-Test ergab sich unter Bezug auf die Abtötungsquotienten eine hochsignifikante ($\alpha \leq 0.001$) Verbesserung der Abwehrleistung durch die ATT (S. 75).

Zeitpunkt der Bakterizidiebestimmung		Mittelwerte der Abtötungsquotienten
NG (Sepsisfälle)	<u>vor 1. ATT</u>	
	undialysierte Seren	- 43.4 = <u>Anwachsen</u>
	dialysierte Seren	- 3.6 <u>der Bakterien</u>
	<u>nach ATT</u>	
	undialysierte Seren	88.6
	dialysierte Seren	80
NG (Sepsisfälle)	<u>vor 2. ATT</u>	
	undialysierte Seren	1.7
	dialysierte Seren	7.2
	<u>nach 2. ATT</u>	
	undialysierte Seren	40.5
	dialysierte Seren	37.5

Tab. 46: Vergleich der Abtötungsquotienten von ATT-Patienten vor und nach 1. und 2. ATT, siehe Tab. 30, 31 und 34

Im Falle einer notwendigen zweiten ATT war die Abwehrleistung (ausgedrückt durch die Abtötungsquotienten) gegenüber der Situation vor 1. ATT weniger stark vermindert.

Bei den Verlaufskontrollen über 4 Monate nach ATT ergaben sich (mit Ausnahme von Patient 5) Abtötungsquotien-

ten von

61.7	bis 95.3 %	nach 1 Monat	(n = 6)
43	bis 95.6 %	nach 2 Monaten	(n = 5)
62	bis 86.8 %	nach 3 Monaten	(n = 3)
65.7	bis 86.2 %	nach 4 Monaten	(n = 3).

Die zelluläre Abwehr (NG-Granulozyten mit Erwachsenenserum war vor ATT (n = 21) nur mäßig vermindert (Abtötungsquotienten von 57 bis 69%). Sie konnte in unseren Fällen durch die ATT nicht verbessert werden.

5.3.2 Vergleich der Serumproteinkonzentrationen vor und nach ATT (Tab. 27).

Im Rahmen unserer Versuchsreihe wurden parallel zum Bakterizidietest auch die Konzentrationen von IgG, IgM, IgA und C3c gemessen. Auffallend war vor ATT in 6 von 9 Fällen eine niedrige IgG-Konzentration, während die IgM-Konzentration in 5 Fällen und die IgA-Fraktion in 8 Fällen sehr hoch waren. Bis auf eine Ausnahme (Patient 4) konnten sämtliche Fraktionen durch die ATT verbessert werden.

5.3.3 Vergleich der Letalität von postoperativen Sepsisfällen mit und ohne ATT

Die ATT bei postoperativen Sepsisfällen von NG wurde in der v.Haunerschen Kinderklinik nach vereinzelten ATT in früheren Jahren ab 1975 fast routinemäßig durchgeführt. Ein Vergleich mit einer Gruppe von postoperativen Sepsisfällen ohne ATT (Tab. 9) ist jedoch nur statistisch möglich, da keine Testergebnisse vorliegen. Es handelt sich um 24 NG mit vergleichbarem Schweregrad von Krankheit und Operation, von denen 19 innerhalb der ersten 2 Lebenstage und 5 innerhalb der ersten Wochen operiert wurden. Von diesen 24 Patienten überlebten nur 3, dies entspricht einer Letalität von 87.5 %.

Die ATT an den von uns untersuchten NG wurden von Oktober 1976 bis Mai 1977 durchgeführt. Von 11 Patienten starben 4 ca. 24 Std. nach der ATT:

Patient 1 an intrazerebralen Blutungen

Patient 3 an Hochdruck infolge eines Glomustumors

Patient 11 an einer Sepsis (antibiotikaresistente E. coli)

Patient 6 (26. SSW) an einer Candida-Sepsis. Es gibt Hinweise dafür (62), daß bei Candidasepsis durch Serungabe kein Effekt zu erzielen ist, da es sich hier um einen Defekt der intrazellulären Abtötung beim NG handelt.

1 Monat nach ATT verstarb

Patient 10 nach einer 2. ATT

2 Monate nach ATT starb

Patient 4 ebenfalls infolge der Sepsis
(32 SSW)

Wie aus diesen Ausführungen zu ersehen ist, dürfte zumindest bei den Patienten 1 und 3 der direkte Zusammenhang des letalen Ausgangs mit der Sepsis zweifelhaft sein.

Bei den von uns überprüften Patienten ergab sich also eine Letalität trotz ATT von 54.5 %, bei der Patientengruppe aus den Jahren 74 - 77 (Tab. 11) verstarben 5 von insgesamt 8 ATT-Patienten, dies entspricht einer Letalität von 63 %.

Ausgehend von einer Sterberate von 87.5% bei postoperativen Sepsisfällen ohne ATT konnte also durch die ATT eine Verbesserung von 24 - 33 % erzielt werden.

5.4 Vergleich der Immunantwort von Säuglingen vor und nach Operation.

Ein Vergleich der Mittelwerte der Abtötungsquotienten vor und nach Operation ergab identische Werte, d.h. Abtötungsquotienten von 50% bzw. 49% (Tab. 39). Bei Betrachtung von Einzelfällen (Wilcoxon-Test) ergab sich jedoch eine statistische Auffälligkeit ($\alpha \leq 0.05$, Tab. 40) im Hinblick auf eine erhöhte Bakterizidie nach Operation (erhöhte Abtötungsquotienten in 11 von 18 Fällen).

Bei den Immunglobulinkonzentrationsbestimmungen fielen nach Operation der erniedrigte IgG-Gehalt und die erhöhten IgM- und IgA-Werte im Vergleich zu den präoperativen Bedingungen auf. Die Veränderungen der δ -Globulin-Konzentration nach Operation entspricht auch den Werten, welche bei den postoperativen Sepsisfällen vor ATT bestimmt wurden. Sie wurde ebenfalls von RYHÄNEN (48), (siehe 2.1.2.1, Tab. 2) beschrieben, wobei auch auf die Möglichkeit einer geringgradigen Verbesserung der Immunantwort nach Operation hingewiesen wird, wie sie in unserer Versuchsreihe in 11 von 18 Fällen beobachtet wurde.

5.5 Abnahme der Abwehrfunktion des ATT-Blutes durch die Lagerdauer.

Die Konzentrationsabnahme von Immunglobulin und C3c (Tab. 41) ist nur bei Lagerung in Zimmertemperatur von Bedeutung, hier ergibt sich nach 64 Std. ein Verlust von 7 - 25 %, der δ -Globulin-Fraktion und 80% der C3c-Konzentration. Unter Kühlraumbedingungen (4° C) konnten keine Verluste innerhalb dieses Zeitabschnitts gemessen werden.

Die Bestimmung der Bakterizidie (Tab. 42) ergab eine erhebliche Verminderung bei Lagerung von ATT-Vollblut mit ACD-Zusatz zwischen 4 und 8 Stunden. Es wurde sowohl die kurze Halbwertszeit der Granulozyten (Konzentrationsabfall auf 70 %) als auch der effektive Funktions-

verlust bei konstanter Granulozytenzahl (reduziert auf 75%) berücksichtigt, wobei insgesamt eine reduzierte Bakterizidie von 53 % entsteht. Ohne ACD-Zusatz treten diese Verluste aufgrund des beschleunigten Zellzerfalls schon nach 2 Stunden auf (Abb. 24).

6 DISKUSSION

6.1 Beurteilung der Methoden

6.1.1 Reproduzierbarkeit des Bakterizidietest

Die Beurteilung der Ergebnisse setzt Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Tests voraus.

Die Variabilität in der Konzentration der zellulären und humoralen Blutbestandteile ist auf die unterschiedliche Abwehrlage des Organismus zum Zeitpunkt der Blutabnahme zurückzuführen.

In 4.3 wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Blutlagerungszeiten überprüft und festgestellt, daß nach 4 - 8 Stunden Wartedauer bei Zimmertemperatur vor Beginn des Tests nur noch ca. 53 % der zellulären Abwehrfunktion nachweisbar ist. Aus diesem Grunde wurde darauf geachtet, daß die Lagerzeiten der Granulozyten vor Inkubation zum Zeitpunkt 0 um nicht mehr als eine halbe Stunde variierten. In 4.3.2.2 wurde bei Serum-lagerung in Raumtemperatur bis zu 6 Stunden keine Verminderung der serumabhängigen Bakterizidie und in 4.3.1 kein Immunglobulin- und C3c-Konzentration festgestellt. Aus diesem Grunde dürften die aus den Wartezeiten resultierenden Fehler zu vernachlässigen sein.

Die Reproduzierbarkeit des Bakterizidie-Ergebnisses ist abhängig von Fehlerquellen, die in der hohen Verdünnung (3.2.1.1.4) von Granulozyten und Bakterien (Pipettierfehler) liegen, sowie der photometrischen Bestimmung der Bakterienkonzentration und der Abweichung bei der mikroskopischen Granulozytenzählung. Bei der photometrischen Bestimmung können lebende und tote Bakterien nicht voneinander unterschieden werden. Die hohe Varianz (15 - 20%) der Granulozytenzählung ist bedingt durch den Fehler der kleinen Granulozytenzahl und eine oft nicht vermeidbare Inhomogenität der Leukozytensuspension in der Essigsäurelösung.

Eine Aussage über die Genauigkeit der Daten aus dem Bakterizidietest ergibt sich aus einem Vergleich der Anfangskonzentrationen der Bakterienkolonien, da zu diesem Zeitpunkt die interindividuellen Unterschiede in der Abwehrfunktion noch nicht zum Tragen kommen. Um zu ermitteln, ob die verschiedenen Anfangskonzentrationen der Bakterienkolonien einer Normalverteilung unterliegen, wurden insgesamt 163 Testansätze aus verschiedenen Einzeluntersuchungen ausgewertet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung sollten die Bakterienkolonienzahlen graphisch auf dem Wahrscheinlichkeitspapier eine Gerade ergeben. Dies trifft nach Abb. 25 zu. Außerdem erhält man graphisch einen Mittelwert von 218 Kolonien bei einer Standardabweichung von ± 56 Kolonien. Gleiche Werte ergeben sich auch bei der rein rechnerischen Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung.

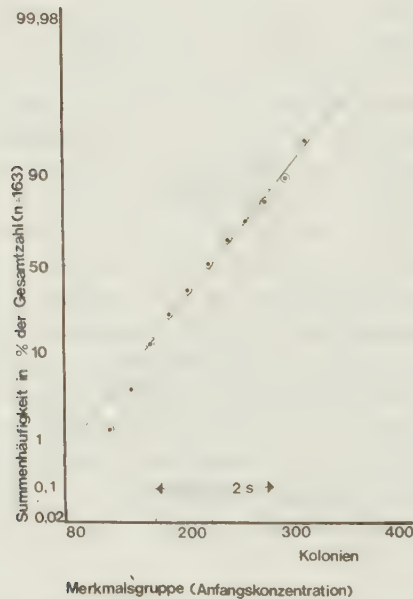


Abb. 25: Ermittlung der Normalverteilung von Anfangskonzentrationen der Bakterienkolonien auf Wahrscheinlichkeitspapier.

Die Reproduzierbarkeit des bakteriziden Verhaltens wird ermittelt anhand der Endkonzentrationen von Erwachsenenenserum.

Da die Abtötungsquotienten von Kontroll- und Poolserum kaum Unterschiede aufweisen (81.2 ± 12.4 % bei $n = 34$ bzw. 82.9 ± 12.3 % bei $n = 37$), wurden aufgrund dieses gleichartigen Verhaltens beide Testgruppen gemeinsam zur Ermittlung einer Normalverteilung der Endkonzentrationen herangezogen.

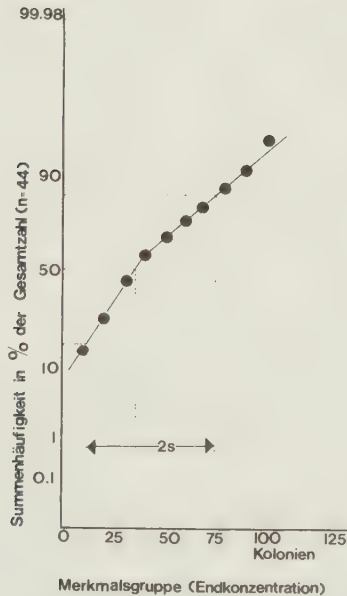


Abb. 26: Prozentuale Summenhäufigkeit in Abhängigkeit von der Endkonzentration der Bakterienkolonien.

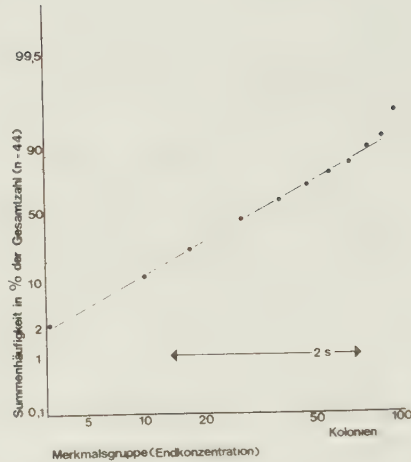


Abb. 27: Prozentuale Summenhäufigkeit in Abhängigkeit der logarithmisch aufgetragenen Endkonzentration der Bakterienkolonien.

Die graphische Auftragung auf Wahrscheinlichkeitspapier zeigt ($n = 71$), daß die Endkonzentrationen nur annähernd einer linearen, wohl aber einer logarithmischen Normalverteilung unterliegen, wie es allgemein der Fall ist, wenn einzelne Fehlerquellen multiplikativ auf das Ergebnis wirken (Abb. 26 und 27). Diese Fehlerquellen (Pipettierfehler, Fehler in der Granulozyten- oder Bakterienbestimmung, S. 100) beeinflussen das

Endergebnis stärker als die Anfangskonzentration, da der Testablauf ein konstantes Verhältnis der einzelnen Variablen (Granulozyten, Bakterien) zueinander erfordert, während in die Anfangskonzentration nur Bakterienkonzentration und Verdünnung miteingehen. Insgesamt kann aus den Abb. 25 und 27 geschlossen werden, daß die Anforderung an die Genauigkeit des Tests und die Reproduzierbarkeit der Testaussage (Bakterizidie eines Normserum) unter Berücksichtigung gewisser testbedingter Abweichungen erfüllt sind.

6.1.2 Auswirkungen des Dialyseverfahrens auf die Testergebnisse
Durch die Dialyse eines Erwachsenenserum konnte die Konzentration des Antibiotikum Oxacillin (90% Proteinbindung), (57) auf 5 % reduziert werden.

Die ATT-Patienten wurden jedoch durchwegs mit Antibiotika behandelt, welche eine wesentlich geringere Proteinbindung aufweisen als Oxacillin.

Es ist also anzunehmen, daß unter endgültigen Versuchsbedingungen mit NG-Serum und einem Antibiotikum von geringer Proteinbindung eine fast vollständige Antibiotikaeliminierung durch die Dialyse erreicht werden kann.

Den direkten bakteriziden Effekt des Restgehalts sollte der Einsatz von antibiotika-resistenten *Serratia marcescens* verhindern (5.1).

Bei einem Vergleich der Ergebnisse im Bakterizidietest von dialysierten und undialysierten Seren (bei Verwendung von *Serratia marcescens*) ergibt sich zwar eine gleichwertige Aussage in Bezug auf eine Verbesserung der Abwehr nach ATT. Andererseits fällt bei den undialysierten Seren vor ATT ein wesentlich geringerer Abtötungsquotient (Tab. 47) bei größerer Standardabweichung auf. Im Wilcoxon-Test ergibt sich jedoch keine statistische Auffälligkeit.

Art des Serum	Prozentuales Anwachsen der Bakterienkolonien nach 120 min. in % des Ausgangswertes (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)
dialysiert	+ 3 % ($\pm$ 50.6) n = 10
undialysiert	+ 43 % ($\pm$ 129) n = 11

Tab. 47: Vergleich der Mittelwerte des Bakterienwachstums bei ATT-Patienten vor ATT als Ausdruck verminderter Bakterienabtötung.

Das Serum 5 wies andererseits nach Dialyse einen wesentlich geringeren Abtötungsquotienten auf als vor Dialyse, nämlich 52.2 % im Gegensatz zu 93% (Tab. 32). Es muß angenommen werden, daß sich das Bakterium *Serratia marcescens* in diesem Fall nicht resistent gegenüber der Antibiotikawirkung verhielt oder daß eine indirekte Stimulierung der Abwehr stattfand. Diese indirekte Wirkung von Antibiotika auf Phagozyten und Monozyten wurde auch von ADAM et al. (1, 2) beschrieben. Durch einen ähnlichen indirekten Effekt könnte auch die in Tab. 47 aufgeführte verminderte Abwehr bei antibiotikahaltigem Serum unter Verwendung von resistenten Bakterien zu erklären sein (46).

Diese unterschiedlichen Werte verdeutlichen, daß beide Möglichkeiten (einerseits die Dialyse durch den Serum proteinverlust und den noch verbleibenden Antibiotikarestgehalt und andererseits die Verwendung von antibiotikaresistenten *Serratia marcescens* durch das Vorkommen einer Antibiotikaempfindlichkeit und durch eine indirekte Wirkung auf das bakterizide System) nicht unwesentliche Fehlerquellen mit sich bringen. Auch bei gleichzeitiger Anwendung beider Methoden zur Ausschaltung dieser Unsicherheitsfaktoren (evt. Antibiotikaempfindlichkeit und indirekte Wirkung auf die Phagozytose durch die Antibiotika) ist noch mit einem Serumproteinverlust durch die

Dialyse und einem indirekten Einfluß der restlichen Antibiotika auf die Abwehr zu rechnen, beide Effekte dürften dann allerdings minimal sein. Die Tatsache, daß trotz Serumproteinverlust die dialysierten Seren einen besseren Abtötungsquotienten aufweisen, dürfte gegen einen testbedingten Effekt sprechen. Aus diesem Grunde kann man davon ausgehen, daß die Dialyse vor Einsatz von antibiotika-resistenten Bakterien zur Ermittlung der tatsächlichen Abwehrleistung trotz möglicher Fehlerquellen geeignet ist.

6.1.3 Relevanz der in-vitro-Bakterizidie im Verhältnis zum in-vivo-Geschehen.

Bei der Interpretation des Kurvenverlaufs der Abtötungsrate (4.2.1, 5.2.1) ist zu berücksichtigen, daß dieser Test nicht mit in-vivo-Bedingungen zu vergleichen ist. Im Körper beginnt die Leukozytenmigration aus der Blutbahn ins Gewebe etwa nach einer halben Stunde, außerdem beträgt die Wanderungsgeschwindigkeit im Gewebe 3 - 8 mm pro Tag. In vivo kann also deutlich zwischen humoraler Früh- und zellulärer Spätphase unterschieden werden im Gegensatz zum in-vitro-Geschehen.

In vitro ist der Reaktionsablauf auf 1 ml Zell- und Bakteriensuspension beschränkt. Zusätzlich nimmt die Anzahl der Granulozyten und Bakterien proportional zur Phagozytose ab, während im Körper laufend Phagozyten (und im Fall einer Sepsis auch Bakterien) nachdiffundieren. Die bei Erwachsenen zu beobachtenden Abtötungsraten (Abb. 12, 13, 14) im Sinne einer logarithmischen Funktion dürften also Ausdruck der abnehmenden Zellen und Bakterien sein, wobei schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt ein großer Teil der Bakterien abgetötet werden ($t_{i/2} = \text{ca. } 1 \text{ Std.}$). Im Gegensatz dazu beträgt die Halbwertszeit bei Säuglingen ca. 2 Std. und bei NG (Sepsisfälle) nimmt die Bakterienkonzentration zu (Tab. 26).

Diese Gegenüberstellung könnte im Sinne einer verlangsamen Reaktion der Serumfaktoren bei Säuglingen interpretiert werden, wobei nicht zu entscheiden ist, ob es sich um die verspätete spezifische Ag-Erkennung handelt oder ob diese Beobachtung auf einen Serumproteinmangel zurückzuführen ist.

6.2 Beurteilung der Ergebnisse

6.2.1 Bakterizidietest und Immunglobulinbestimmungen im Hinblick auf ATT und Operation

Unmittelbar nach ATT ergibt sich eine hochsignifikante Verbesserung der humoralen Abwehr im Bakterizidietest (Tab. 32, 5.2.2), in unseren Tests konnte jedoch keine Verbesserung der zellulären Immunität nachgewiesen werden, allerdings war die Granulozytenfunktion vor ATT bei den NG-Sepsispatienten nur mäßig vermindert (Abtötungsquotienten von 70 bzw. 88 % der Erwachsenenfunktion, 4.2.2.3). Dies wäre eine weitere Bestätigung für die Annahme, daß durch die ATT hauptsächlich eine Verbesserung der Abwehrsituation durch Substitution der humoralen Bestandteile des Immunsystems erreicht wird (2.2.1). Hierzu wurden im Rahmen unserer Versuchsreihe die Serumproteinkonzentrationen von IgG, IgM, IgA und C3c vor und nach ATT gemessen (Tab. 27, 5.2.3). Auffallend niedrig ist ebenso wie bei den gesunden Säuglingen nach Operation (5.4) der niedrige IgG-Gehalt vor ATT und die IgM- und IgA-Erhöhung. Bei den postoperativen Sepsisfällen ist der IgG-Verbrauch offensichtlich durch die Operation und die Infektion entstanden. Eine Synthese von IgG wird durch die mütterlichen Ak in einem größeren Ausmaß verhindert als dies bei IgM und IgA der Fall ist.

Durch die ATT wurden (mit Ausnahme von Patient 4, siehe 6.3) alle γ -Globulin-Fraktionen erhöht. Diese Verbesserung der Serumproteinfraktionen ist bekannt und wird

von den verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt. XANTHOU (47) weist darauf hin, daß der Immunglobulinspiegel sehr schnell wieder sinkt, er findet 72 Std. nach ATT, NEJEDLA nach wenigen Tagen (40) und PRODHOM (44) nach 48 Std. die ursprüngliche Immunglobulinkonzentration wie vor ATT.

Diese Beobachtung konnte im Bakterizidietest in unseren Fällen nicht bestätigt werden. Selbst innerhalb von 4 Monaten nach ATT konnte noch eine dem Alter entsprechend überdurchschnittliche Bakterizidie festgestellt werden, die einzelnen Proteinfractionen wurden nur in einem Fall gemessen (Patient 9, Tab. 27 a). Der Immunglobulin- und C3c-Gehalt bewegt sich in diesem Fall 5 Wochen nach ATT zwischen den Werten vor ATT und unmittelbar nach ATT. Da die Halbwertszeit von IgG mehrere Wochen und die von IgM und IgA eine Woche betragen, sind diese Werte nicht unrealistisch.

Ein weiterer in der Literatur beschriebener Effekt der passiven Immunisierung ist die verspätet einsetzende aktive Immunglobulinsynthese bei NG mit ATT, welche im Falle der IgG-Synthese nach NEJEDLA (40) erst mit 6 Monaten einsetzt anstatt mit 3 Monaten bei normalen NG ohne ATT.

6.2.2

Veränderungen von humoralen und zellulären Immunfaktoren während der Lagerung von Blutkonserven.

Die Bedeutung der Lagerzeit wird an Patient 4 deutlich, welcher bei der ATT Frischblut erhalten hatte, wobei der Abtötungsquotient des Spenderblutes schon erheblich vermindert war (Tab. 37). Die Verlaufskontrollen bestätigen weiterhin auch eine sehr schlechte Abwehrleistung während der nächsten 2 Monate.

Bei längerer Lagerzeit nimmt die Anzahl der Granulozyten, Thrombozyten und die Konzentration von 2.3 DPG ab und es treten durch die Zell-Lyse Elektrolytverschiebungen

in Form von Hyperkaliämie und Hyponatriämie auf (2.2.4.c). Nach 7 Tagen Lagerung unter Kühlraumbedingungen (4°C) sollte mit einem quantitativen Verlust der Immunglobuline von 50% gerechnet werden (54). In dieser Studie wurde in erster Linie ein Proteinverlust bei Lagerung in Raumtemperatur gemessen, es treten allerdings erst nach ca. 64 Std. größere Verluste auf.

Wesentlich ist jedoch der zelluläre Defekt durch die Zell-Lyse und die Funktionseinschränkung der Granulozyten. Hier sollte eine Lagerdauer bei Zimmertemperatur unter 8 Stunden eingehalten werden. Demgegenüber gab McCullough et al. (36) an, daß die Bakterizidie von Granulozyten innerhalb von 24 Std. nur unwesentlich verringert würde. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß in dem dieser Veröffentlichung zugrundeliegenden Bakterizidietest ein Verhältnis von Granulozyt/Bakterium von 1:1 gegeben war, während in unserem Fall das Verhältnis 1:2 betrug, wobei dieses Verhältnis eine empfindlichere Methode zum Nachweis von Funktionseinschränkungen darstellen dürfte.

ZUSAMMENFASSUNG

Neugeborene und Frühgeborene sind vor allem aufgrund der Unreife ihres humoralen Immunsystems (siehe S. 16 und 4.2.2.3) besonders infektionsgefährdet (2.1.1). Diese Situation wird besonders bedrohlich bei einem notwendigen operativen Eingriff infolge des Infektionsrisikos durch Gewebsläsion und intensivpflegerische Maßnahmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zusätzliche Belastung des Organismus durch die Operation (Gewebsläsion und Narkose) bei Säuglingen (4.2.3) und die Verbesserung der Abwehrsituation durch die ATT mit Erwachsenenblut (4.2.2.2, 4.2.2.3) unter besonderer Berücksichtigung der Lagerdauer des Spenderblutes (4.3) im Bakterizidietest und durch Bestimmung der Immunglobulin-konzentration im Serum überprüft.

Diese Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse:

- 1) Bei den von uns untersuchten postoperativen Sepsisfällen (NG) und bei den Säuglingen (Durchschnittsalter 3 Monate) konnte eine verlangsamte Abwehrreaktion beobachtet werden. Die Halbwertszeit der Bakterienabtötung (humorales System) ist beim Säugling verdoppelt, beim Sepsispatienten (NG) nicht meßbar verlängert (5.2, 6.1.3). Der mittlere Bakterienabtötungsquotient ist beim Säugling 50% im Vergleich zu ca. 86% bei Pool- und Kontrollseren (Erwachsene), bei den NG (Sepsispatienten) ergibt sich keine Verminderung der Bakterienkonzentration nach 2 Stunden (S. 94). Die zelluläre Abwehr erscheint beim NG (Sepsispatienten) nicht wesentlich beeinträchtigt (70 - 88% der Abwehrleistung von Erwachsenenserum (4.2.2.3)).
- 2) Durch die Operation konnte bei Säuglingen im Durchschnitt keine Veränderung der Bakterizidie festgestellt werden (Tab. 39 und 40). Der mittlere Abtötungsquotient beträgt nach Operation 49% im Gegensatz

zu 50% vor Operation. Im Wilcoxon-Test ergibt sich jedoch eine statistische Auffälligkeit im Hinblick auf eine verstärkte Abwehr nach Operation bei Berücksichtigung der Abwehrleistung der einzelnen Patienten. Bei Bestimmung der Serumproteine wird ein IgG-Verlust (in allen untersuchten Fällen) bei gleichbleibender bzw. erhöhter IgM- bzw. IgA-Konzentration nachgewiesen als Ausdruck eines Immunglobulinverbrauchs mit aktiver Immunisierung, wobei die IgG-Synthese durch die mütterlichen Antikörper verhindert zu werden scheint.

- 3) Durch die ATT konnte die Letalitätsrate von postoperativen Sepsisfällen von 87.5% (ohne ATT) auf 55% gesenkt werden. Bei einer Kontrollgruppe mit ATT aus früheren Jahren ergab sich eine Letalität von 63% (5.3.3, 3.2.6).
- 4) Die Verbesserung der Abwehr im Bakterizidietest durch die ATT war hochsignifikant (S. 76), bei den von uns untersuchten Fällen wurde durchwegs eine etwa dem Spenderblut entsprechende Bakterienabtötung unmittelbar nach ATT ermittelt (Bakterienabtötungsquotient von 80% bei dialysierten Seren und 88.6% bei undialysierten Seren, siehe Tab. 30 und 31).
- 5) Bei Verlaufskontrollen über 4 Monate kann die Abwehrleistung weiterhin als dem Alter entsprechend überdurchschnittlich bezeichnet werden (Bakterienabtötungsquotienten von 65.7% bis 86.3% im 4. Monat).
- 6) Vor einer notwendigen 2. ATT konnte eine bessere Bakterizidie nachgewiesen werden als vor der 1. ATT. Ohne Berücksichtigung von Patient 4 (Gabe von weniger funktionsfähigem Frischblut, siehe Definition) ergibt sich ein mittlerer Abtötungsquotient von 47.8% bis 52.5%. Die 2. ATT scheint somit primär der Keimausschwemmung zu dienen.
- 7) Ein wichtiges Kriterium für den Behandlungserfolg dürfte mit Sicherheit die Lagerzeit des ATT-Blutes

darstellen (6.3, siehe Patient 4). Da in dieser Studie sämtliche überlebenden Patienten mit Warmblut ausgetauscht wurden, während 3 der 6 verstorbenen Sepsispatienten Frischblut erhalten hatten, scheint die Gabe von Warmblut erforderlich. Aufgrund des von uns bestimmten Granulozytenfunktionsverlustes (siehe 4.3, Abnahme der zellulären Bakterizidie nach 8 Stunden Lagerung bei Zimmertemperatur auf 53 bis 56%, die humorale Abwehr wird in diesem Zeitraum nur unerheblich beeinträchtigt), sollte in jedem Fall eine Wartezeit vor ATT von 4 - 8 Stunden nicht überschritten werden (6.2.2).

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Bakterizidietests konnte durch das Vorliegen einer Normalverteilung von Anfangs- und Endkonzentrationen nachgewiesen werden (6.1.1, Abb. 25 - 27).

Durch das Dialyseverfahren mit anschließender Verwendung von antibiotika-resistenten *Serratia marcescens* (siehe auch Dissertation MAGERL) sollte sowohl der direkte bakterizide Effekt der Antibiotika als auch der indirekte Einfluß auf Phagozyten und Monozyten verhindert werden (4.1.3, Abb. 9 und 10, 6.1.2).

Bei der Behandlung von postoperativen Sepsisfällen durch ATT wird man sich bewußt sein, daß diese Therapiemöglichkeit kein Ersatz für die Antibiotikabehandlung darstellt. Sie ist jedoch aufgrund des physiologischen Immundefekts des NG und des zusätzlichen IgG-Verbrauchs durch die Operation eine Kombinationstherapie zur Antibiotikamedikation. Sie empfiehlt sich umso mehr, als es Hinweise dafür gibt, daß eine Antibiotikamedikation nur in Gegenwart eines intakten Abwehrsystems sinnvoll ist (30, siehe auch 2.2). Für die Zukunft wäre jedoch die Substitution von isolierten Immunglobulinen und Komplementfaktoren anzustreben, da die ATT auch eine Kreislaufbelastung für das NG darstellt (siehe 2.2.4, Risiken der ATT).

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ADAM D., SCHAFFERT W., MARGET W.,
Enhanced in vitro phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human monocytes in the presence of Ampicillin, Tetracycline and Chloramphenicol
Infect. Immunity 5:811, 1974.
- (2) ADAM D., STABER F., BELOHRADSKY B.H., MARGET W.,
Effect of Dihydrostreptomycin on phagocytosis of mouse-peritoneal macrophages in vitro.
Infect. Immunity 2: 537, 1972
- (3) BELOHRADSKY B.H., MARGET W.,
Neugeboreneninfektionen in: Pädiatrie in Praxis und Klinik, eds: Bachmann K.D., Ewerbeck H., Joppich G., Kleinhauer E., Rossi E., Stalder G.R., Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1: 136 (1978)
- (4) BELOHRADSKY B.H., ROOS R., MARGET W.,
Exchange transfusion in neonatal septicemia
Infection 6, Suppl. 1: 139 (1978)
- (5) CHOW A. W., LEAKE R.D., YUMANDI T., SUZE B.F.A. and GUEZ L.B.,
The significance of anaerobes in neonatal bacteremia in: *Pediatrics* 54: 736 - 745 (1974).
- (6) CLARK C.E.,
Retrolentale Fibroplasie: Austauschtransfusionen erhöhen Risiko in: *Medical Tribune*, Kongreßbericht, 25. Juli 1975
- (7) CULLEN B.F. and CHRETIEN P.B.
Ketamine and in vitro lymphocyte transformation in: *Anaesth. Analg.* 52: 518 (1973).

- (8) DOSSET J.H., WILLIAMS R.C. and QUIE P.G.
Studies on interaction of bacteria, serum factors
and polymorphonuclear leukocytes in mothers and
newborns, *Pediatr.* 44: 49, 1969.
- (9) FANAROFF A., MARSHALL K.,
Neonatal infections. In: Care of the high-risk
neonate, W.B. Saunders Philadelphia, London, To-
ronto, p. 205 (1973).
- (10) GANONG W.F.,
Altersabhängigkeit spezifischer Abwehrmechanismen.
In: Lehrbuch d. Med. Physiologie, Springer Verlag,
Verlin, Heidelberg New York. 3: 461 (1974)
- (11) GOLDBAUM L.R. and SMITH P. K.,
The interaction of barbiturates with serum albumin
and its possible relation to their disposition and
pharmacological actions
J. of Pharmacology, p. 197 (Febr. 1954).
- (12) GORMAN J.G.,
The role of the laboratory in hemolytic disease
of the newborn. Lea and Febiger, Philadelphia,
1975.
- (13) HAHN H., OFFERKUCH W.,
Mechanismen der immunologischen Infektabwehr.
In: Praxis der Immunologie, ed: Vorländer K.-O.,
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1: 76, 81 (1976)
- (14) HARNACK G.A.,
Bevölkerungsstatistik. In: Kinderheilkunde, Sprin-
ger-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
3: 441 (1974).

- (15) HEY E.N., ELLIS M.I. and WALKER W.,
Ileocolitis after exchange transfusion,
Lancet I: 266 (1972).
- (16) HOFMANN J.W., HEIM L.R., BOULANGER W.J. and
DE COSSE J.J.,
The effects of surgery on cellular immunity
Wisconsin Med. 72: 249 (1973).
- (17) HUBER-FICKLER M.
Die Austauschtransfusion in der Mitbehandlung der
Neugeborenen-Sepsis (Thesis 1979), München
- (18) HUMBERT J.R., KURTZ M.L., HATHAWAY W.F.,
Increased Reduction of Nitroblue Tetrazolium by
Neutrophils of Newborn Infants, Pediatrics 45 : 125,
(1970)
- (19) JOHNSTON R.B., and STROUD R.M.,
Complement and host defense against infection.
In: Pediatr. 90, No.2 (169), Febr. 1977
- (20) JUBERTS A.V., LEE E.T., HESH E.M. and McBRIDE C.M.
Effects of surgery, Anesthesia and intraoperative
blood loss on immunocompetence.
J. Surg. Res. 15: 399 (1973)
- (21) KLEBANOFF S.J.
Antimicrobial systems of the polymorphonuclear
leukocyte. In: The phagocytic cell in host resistance.
ed: Joseph Bellar and Delbert H. Dayton, Raven Press,
New York, 45 - 57 (1975).
- (22) KLOSE H.J., MUNTEAN W., BELOHRADSKY B.H. und
LINDERKAMP O.
Die Austauschtransfusion als Therapie von Störungen
der Hämostase bei Neugeborenen. In: Perinatale Me-
dizin, Bd. VII, Eds. Schmidt, Dudenhausen, Saling.
Thieme-Verlag Stuttgart, p. 630, 1978.

- (23) KÖPCKE W., DASCHNER F., MARGET W., van EIMEREN W.
Maßnahmen gegen Hospitalinfektionen,
Med. Klin. 71: 1057 (1976)
- (24) KOWNATZKI E.
Humorale Immunreaktionen. In: Praxis der Immunologie. Ed. Vorlaender K.-O., Georg Thieme Verlag
Stuttgart, 1: 11 (1976)
- (25) KOWNATZKI E.
Antigene und Antigenität. In: Praxis der Immunologie. Ed. Vorlaender K.-O., Georg Thieme Verlag
Stuttgart, 1: 6 (1976)
- (26) LYNCH M.J.
Year Book in Pediatrics, 1978, p. 322
- (27) MAGALIN S.J., SCRACIA E., ODDI N.D., GIACOMO M.,
Aspetti immunologici in anesthesia, Acta Anaesth.
Italica, Suppl. 25: 196 (1974).
- (28) MAGERL M.
Dissertation München, 1979
- (29) MANN F.C.
Some bodily changes during anaesthesia,
JAMA 67: 172 (1976)
- (30) MARGET W.
Praxis der Antibiotika-Therapie im Kindesalter
In: Die Berliner Ärztekammer, 12: 417 - 421 (1968)
- (31) MARGET W.
Praktische Probleme der Chemotherapie im Säuglingsalter, Regensburger Ärztliche Fortbildung
XIV: 1 - 4 (1966)

- (32) MARGET W.
Unbesiegte und "unbesiegbare" bakterielle Infekte.
Therapiewoche, Verlag G. Braun, Karlsruhe
26: 7905 - 7910 (1976)
- (33) MARGET W., BELOHRADSKY B.
Diagnostik, Klinik und Therapie der Neugeborenen-
Infektionen, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York, 4: 222 - 228 (1971)
- (34) MARGET W., DASCHNER F.
Die Intensivpflegestation: das Mekka für Mikroben,
Sonderdruck aus Fortschritte der Medizin
89: 895-896 (1971).
- (35) Mc CRACKEN G.H., SHINEFIELD H.,
Changes in the pattern of neonatal septicemia and
meningitis. Amer. J. Dis. Child. 112: 33 (1966)
- (36) Mc CULLOUGH, BENSON J., EDMOND J.Y., QUIE P.G.
Effect of blood-bank storage on leukocyte function.
Lancet, p. 1333 (1969).
- (37) MILLER M.E.
Deficiencies in chemotactic function in the human
neonate. Pediatric research 3: 497 (1969).
- (38) MILLER M.E.
Natural defense mechanisms : Development and
characterization of innate immunity. In: Immunologic
disorders in infants and children. Eds: Stiehm E.R.,
Fulginiti V.A., p 127 (1973)
- (39) MÜLLER-EBERHARD H.J.
The Phagocytic cell in host resistance.
Eds: Bellanti J.A. and Dayton D.H., Raven Press
New York, p. 87 - 97 (1975)

- (40) NEJEDLA Z.
Der Einfluß der Blutaustauschtransfusion auf
die Entwicklung immunologischer Faktoren
Mschr.Kinderheilk. 114: 107, 1966
- (41) PARK B.H., HOLMES B.M., RODEY G.D. GOOD R.A.,
NBT-Test with children with fatal granulomatous
disease and newborn infants. Lancet I, 157 (1969).
- (42) PARK S.K., BRODY J.I.
Immunosuppressive effects of surgery. Lancet 1:
53 (1971)
- (43) PERKINS H.A.
Immunological investigations of transfusion
reactions. In: Laboratory diagnosis of immunologic
disorders. Vyas G.N., Stites D.P. and Brecher G.
(eds.), Grune and Stratton
- (44) PROD'HOM L.S., CHOFFAT J.M., FRENCK N., MAZOUNI M.,
RELIER J.P. and TORRADO A.,
Care of the seriously ill neonate with hyaline
membrane disease and with sepsis (sclerema neo-
natorum) Pediatrics 53: 170, (1974)
- (45) PROKOPOWICZ J., ZIOBRU J. and IWASZKO-KRAWAZUK W.
Bactericidal capacity of plasma and granulocytes
in small-for-date newborns. Acta Paediatr. Acad.
Scient. Hung. 16: 267 (1975).
- (46) QUADRIPUR S.A.
Medikamentöse Beeinflussung der Phagozytosefähig-
keit der Granulozyten. Ther. d. Gegenwart 115:
1072 - 78 (1976)
- (47) QUIE P.G.
Pathology of bactericidal power of neutrophils
Edt. by the department of Pediatrics, Univ. of
Minnesota Med. School, Grune and Stratton, Inc.
153 - 163 (1975).

- (48) RYHÄNEN P.
Effects of anesthesia and operative surgery on the immune response of patients of different ages. Anal. clin. res., Vol. 9, Suppl. 19, 1977.
- (49) SCHOLTAN W.
Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Eiweißbindung von Sulfonamiden und Penicillinen, Antibiotica und Chemotherapeutica;
Fortschr. 12: 103 - 134.
- (50) SIMBERKOFF M.S., KICUPERO I., RAHAL J.
Host resistance to *Serratia marcescens* infection
J. Lab. clin. Med. 87: 206 - 217 (1976)
- (51) SLADE M.S., SIMMONDS R.L., YUNIS E. and GREENBERG L.J.
Immunodepression after major surgery in normal patients. Surgery 78: 363 (1975)
- (52) SOLBERG C.O., HELLMUM B.J.
Influence of serum on the bactericidal activity of neutrophil granulocyte. Acta path. microbiol. scand. Section B. 81: 621 - 626 (1973)
- (53) TÖLLNER U. and POLANDT F.
Septicemia in the newborn due to gram-negative bacilli. Europ. J. Pediatr., Springer-Verlag 123: 243 - 254 (1976).
- (54) TYMPNER K.D., BRÜCKNER W. und MARGET W.
Quantitative Bestimmungen der Immunglobuline im Serum neugeborener Kinder nach passiver Zufuhr. Sonderabdruck aus "Monatsschrift f. Kinderheilkunde". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
117: 601 - 604 (1969)
- (55) WALTER A.M., HEILMAYER L.,
Antibiotika-Fibel 4 : 206 (1975), Thieme-Verlag

- (56) WARKOTSCH E.A.
Postoperative Todesursachen in der Kinderchirurgie
unter besonderer Berücksichtigung des Krankengutes
von 1970 - 76 (Thesis München 1978)
- (57) WARNATZ H.
Immunsystem. In: Klinische Pathophysiologie
Ed. SIEGENTHALER W., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
2 : 483 (1976)
- (58) WASHBURN T.C., MEDEARIS D.N. and CHILDS B.
Sex differences in susceptibility to infections
Pediatrics p. 57 - 64 (Jan. 1965)
- (59) WINTROBE M.M., Thorn G.W., BENNETT I.L., BRAUNWALD E.
ISSELBACH K.J., PETERSDORF R.G.
Disorders due to hypersensitivity and altered Immune
Response
Principles of internal Medicine, Mc Graw-Hill Book
Comp., p. 343 - 345 (1970)
- (60) WINKELSTEIN J.A., DRACHMAN R.H.
Phagocytosis. Ped. Clinics of North America 21:
551 - 557 (Aug. 1974).
- (61) WRIGHT A.E. and DOUGLAS S.R.

Proc. Roy. Soc. London. S.B. 73: 128 (1904)
- (62) XANTHOU M., VALASSI-ADAM E., KINTZONIDOU E.
MATSANIOTIS N.
Phagocytosis and killing of candida alb. by blood
leukocytes of healthy term neonates
Archiv. of Dis. in Childhood 72 (1975)
- (63) XANTHOU M., NICOLOPOULOS D., GIZAS A. and MATSANIOTIS N.
The response of leukocytes in the peripheral blood
during and following exchange transfusion in the
newborn. Pediatrics 51: 570, 1973.

LEBENS LAUF

Am 13. Oktober 1948 wurde ich als erstes Kind von Friedrich und Katharina Prinz in Wurmannsquick/Ndb. geboren. Ab 1954 besuchte ich die Volksschule in Wurmannsquick und anschließend die Realschule in Eggenfelden.

1965 begann ich meine Ausbildung als Übersetzer in München, die ich mit der Unterbrechung eines zweisemestrigen Auslandsaufenthaltes 1971 am Dolmetscherinstitut München abschloß. Ab 1971 war ich als Übersetzer für Französisch tätig und 1973 absolvierte ich das Abitur am Abendgymnasium München und begann anschließend mein Medizin-Studium an der Ludwig-Maximilian-Universität.

Im Januar 1977 verheiratete ich mich mit Dr. Dr. Stefan Hülsmann.

Die Dissertation wurde in der Universitäts-Kinderklinik (Dr. von Haunersches Kinderspital) durchgeführt.

